

Aus dem Zentrum für klinische Tiermedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Karl Heinritzi

Angefertigt am:
Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
(Dr. Stefan Hörmansdorfer)

Die nasale *Corynebacterium*-Flora des Schweines unter besonderer Berücksichtigung von toxinproduzierenden Arten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Verena Sophie Boschert

aus Oberkirch/Baden-Württemberg

München 2012

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Zerbe

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Ammer

Tag der Promotion: 11. Februar 2012

Meiner Familie
&
Meinem Andy

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	2
2.1	<i>Corynebacterium spp.</i>	2
2.1.1	Taxonomie	2
2.1.2	Morphologie	2
2.1.3	Kulturmorphologie	3
2.1.4	Biochemische Eigenschaften	4
2.2	Toxinproduzierende <i>Corynebacterium spp.</i>	7
2.2.1	Allgemeines	7
2.2.2	Virulenzfaktoren	7
2.2.2.1	Diphtherie-Toxin	7
2.2.2.2	Phospholipase D	8
2.3	Epidemiologie der Corynebakterien	8
2.3.1	Vorkommen und Bedeutung beim Schwein	8
2.3.2	Vorkommen und Bedeutung toxinproduzierender <i>Corynebacterium spp.</i> beim Schwein	10
2.3.3	Vorkommen und Bedeutung beim Menschen	11
2.3.4	Vorkommen und Bedeutung toxinproduzierender <i>Corynebacterium spp.</i> beim Menschen	14
2.4	Nachweis von Corynebakterien	15
2.4.1	Kulturelle Methoden	15
2.4.1.1	Anzucht	15
2.4.1.2	Gram-Färbung	16
2.4.2	Biochemische Differenzierung	16
2.4.3	Chemisch-physikalische Methode	17
2.4.4	Molekularbiologische Methoden	20
2.4.5	Sonstige Methoden	21
2.5	Toxinnachweis	21
3	Material und Methoden	22
3.1	Probenplan und Probenmaterial	22
3.2	Betriebscharakteristika	23
3.3	Probenentnahme und Transport	24

3.4	Definition.....	24
3.5	Bakteriologische Untersuchungen	24
3.5.1	Anzucht und Isolierung von coryneformen Bakterien	24
3.5.2	Stammasservierung	24
3.6	Biochemische Untersuchungen	25
3.6.1	Identifizierung mittels Katalase-Test	25
3.6.2	Identifizierung mittels API Coryne	25
3.6.2.1	Durchführung	25
3.6.2.2	Auswertung	25
3.7	Chemisch-physikalisch Untersuchung - MALDI-TOF Massenspektrometrie..	26
3.7.1	Durchführung	26
3.7.2	Auswertung	26
3.8	Molekularbiologische Untersuchungen.....	27
3.8.1	Allgemeine Vorbereitungen	27
3.8.1.1	Extraktion bakterieller DNA aus frischen Reinkulturen	27
3.8.1.2	Extraktionskontrolle	27
3.8.1.3	MasterMix-Kontrolle	27
3.8.2	Amplifizierung des <i>rpoB</i> -Gens mittels konventioneller PCR.....	27
3.8.3	Herstellung des MasterMixes für die <i>rpoB</i> -PCR	28
3.8.4	Amplifizierung der 16S rDNA mittels konventioneller PCR	29
3.8.5	Herstellung des MasterMixes für die 16S rDNA-PCR	29
3.8.6	Durchführung der PCR.....	29
3.8.7	Detektion der PCR-Produkte mit dem Bioanalyzer	30
3.8.7.1	Handhabung	30
3.8.7.2	Auswertung	30
3.8.8	Aufreinigung der PCR-Produkte	30
3.8.9	Sequenzierung der PCR-Produkte.....	30
3.8.10	Analyse und Auswertung der Sequenzen.....	31
3.9	Statistische Auswertung.....	32
4	Ergebnisse	33
4.1	Verteilung der beprobten Bestände nach Region und Betriebsart.....	33
4.2	Methodenvergleich	34
4.2.1	Identifizierungspotential verschiedener Methoden für coryneforme Isolate ...	34
4.2.2	Übereinstimmungen zwischen den Methoden auf Speziesebene.....	39

4.2.2.1	Vergleich aller drei Methoden.....	39
4.2.2.2	Vergleich MALDI-TOF MS mit der 16S rDNA-Sequenzierung.....	40
4.2.2.3	Vergleich des API Coryne mit der 16S rDNA-Sequenzierung.....	41
4.2.2.4	Vergleich der MALDI-TOF MS mit dem API Coryne.....	41
4.2.3	Identifizierungspotential eines zweistufigen Screeningverfahrens mit MALDI-TOF MS und 16S rDNA-Sequenzierung	42
4.3	Zusammensetzung der nasalen <i>Corynebacterium</i>-Flora und verwandter Arten bei Schweinen.....	43
4.3.1	Unterschiedliche Altersklassen	43
4.3.2	Unterschiedliche Betriebsarten	45
4.3.3	Unterschiedliche Regionen.....	46
4.4	Zusammensetzung der nasalen und tonsillären <i>Corynebacterium</i>-Flora bei Schweinen.....	49
4.5	Abhängigkeit der Zusammensetzung der nasalen <i>Corynebacterium</i>-Flora bei Schweinen von bestimmten Betriebsparametern	51
4.6	Zusammensetzung der nasalen <i>Corynebacterium</i>-Flora und verwandter Arten von Betriebsangehörigen schweinehaltender Betriebe	53
4.7	Vorkommen toxinproduzierender <i>Corynebacterium</i> spp.	54
4.8	Rolle von <i>Corynebacterium ulcerans</i> bei einem Ausbruchsgeschehen in einem landwirtschaftlichen Betrieb	55
5	Diskussion	57
5.1	Methodenvergleich	57
5.1.1	Identifizierungspotential verschiedener Methoden für coryneforme Isolate ...	57
5.1.2	Übereinstimmungen zwischen den Methoden auf Speziesebene.....	62
5.1.2.1	Vergleich aller drei Methoden.....	62
5.1.2.2	Vergleich MALDI-TOF MS mit der 16S rDNA-Sequenzierung.....	64
5.1.2.3	Vergleich des API Coryne mit der 16S rDNA-Sequenzierung.....	65
5.1.2.4	Vergleich der MALDI-TOF MS mit dem API Coryne.....	66
5.1.3	Identifizierungspotential eines zweistufigen Screeningverfahrens mit MALDI-TOF MS und 16S rDNA-Sequenzierung	67
5.2	Zusammensetzung der nasalen <i>Corynebacterium</i>-Flora bei Schweinen.....	69
5.2.1	Unterschiedliche Altersklassen	69
5.2.2	Unterschiedliche Betriebsarten	70
5.2.3	Unterschiedliche Regionen.....	70

5.3	Zusammensetzung der nasalen und tonsillären <i>Corynebacterium</i> -Flora bei Schweinen.....	71
5.4	Die nasale <i>Corynebacterium</i> -Flora des Schweines	72
5.5	Abhängigkeit der Zusammensetzung der nasalen <i>Corynebacterium</i> -Flora bei Schweinen von bestimmten Betriebsparametern	73
5.6	Zusammensetzung der nasalen <i>Corynebacterium</i> -Flora von Betriebsangehörigen schweinehaltender Betriebe	74
5.7	Vorkommen toxinproduzierender <i>Corynebacterium spp.</i>	75
6	Schlussfolgerung.....	77
6.1	Vergleich der drei Methoden MALDI-TOF MS, 16S rDNA-Sequenzierung und API Coryne	77
6.2	<i>Corynebacterium</i> -Flora der Schweine und Betriebsangehöriger schweinehaltender Betriebe.....	78
6.3	Toxinproduzierende <i>Corynebacterium spp.</i>	78
7	Zusammenfassung.....	79
8	Summary	81
	Literaturverzeichnis.....	82
	Tabellenverzeichnis	99
	Abbildungsverzeichnis	101
	Anhang	102
	Danksagung.....	132

Abkürzungsverzeichnis

μM	mikromolar
μl	Mikroliter
°C	Grad Celsius
α -HCCA	alpha-Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure
API	Analytischer Profilindex
ARDRA	Amplifizierte Ribosomale DNA Restriktionsanalyse
bp	Basenpaar
<i>B.</i>	<i>Brevibacterium</i>
<i>Brachybac.</i>	<i>Brachybacterium</i>
<i>Brevibac.</i>	<i>Brevibacterium</i>
<i>C.</i>	<i>Corynebacterium</i>
CAMP-Test	Christie-Atkins-Munch-Petersen-Test
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DT	Diphtherie-Toxin
e	Elementarladung
EDTA	Etylendiamintetraessigsäure
Fa.	Firma
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
griech.	griechisch
h	Stunde
HS	Hygienestatus
k. A.	keine Angaben
kDA	Kilodalton
k. Id. m.	keine Identifizierung möglich
L	Länge der Drift-Strecke
LGL	Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
M	molar

MALDI-TOF MS	Matrix Assistierte Laser Desorption/Ionisation- Flugzeit Massenspektrometrie
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
m/z	Masse/Ladung
NCBI	National Center for Biotechnology Information, US-amerikanisches Institut für Datenverarbeitung und -speicherung in der Molekularbiologie
OS	organische Suspension
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PLD	Phospholipase D
Puffer PB	Phosphatpuffer
Puffer PE	Waschpuffer
Puffer EB	Elutionspuffer
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
<i>rpoB</i>	RNA polymerase beta subunit-encoding gene (beta Untereinheit der RNA-Polymerase)
spp.	Spezies
t	Gesamtflugzeit
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
<i>tox</i> -Gen	Toxin-Gen
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U _a	Beschleunigungsspannung
U	Enzymeinheit
V	Version
v/v	Volumen pro Volumen
Wo.	Woche/Wochen

1 Einleitung

Corynebakterien sind bei Mensch und Tier Teil der physiologischen Haut- und Schleimhautflora. Die meisten besiedeln dabei als apathogene Keime spezifische Nischen, können aber auch opportunistisch pathogen sein. In der Humanmedizin sind die Diphtherie-Erreger die wohl bekannteste pathogene Gruppe. Zu dieser „*C. diphtheriae* Gruppe“ zählen *C. diphtheriae* mit den vier Biovarien *gravis*, *mitis*, *belfanti* und *intermedius*, *C. ulcerans* und *C. pseudotuberculosis*. Die Pathogenität dieser „*C. diphtheriae* Gruppe“ beruht auf der Fähigkeit, ein Toxin produzieren zu können, welches beim Menschen das Krankheitsbild der Diphtherie hervorrufen kann.

Aber auch in der Veterinärmedizin wird seit einigen Jahren ein besonderes Augenmerk auf diese Gruppe pathogener Keime gelegt. Besonders gilt dies für *C. ulcerans*, welches immer wieder als Ursache für Ausbrüche einer Diphtherie-Erkrankung von Tierbesitzern identifiziert werden konnte. So sind beispielsweise Hunde und Katzen schon seit einiger Zeit als klinisch meist unauffällige Träger von *C. ulcerans* bekannt. Durch den Kontakt zum Menschen ist eine Übertragung toxinproduzierender Diphtherie-Erreger möglich und teilweise bereits nachgewiesen (DE ZOYSA et al. 2005; LARTIGUE et al. 2005; HOGG et al. 2009; BERGER et al. 2011).

Neben Haustieren erfahren aber auch Nutztiere eine Relevanz als Infektionsquelle dieser toxischen *Corynebacterium* spp.. So berichten SCHUHEGGER et al. (2009) als erste von der Erkrankung einer Nutztierhalterin an Diphtherie nach Kontakt mit klinisch unauffälligen Schweinen, die mit toxinproduzierenden *C. ulcerans* Stämmen infiziert waren.

Hinsichtlich dieser Erkenntnisse ist es sinnvoll, für die betroffenen Berufsgruppen wie Tierärzte und Landwirte eine Risikoabschätzung durchzuführen. Dazu sollten die Schweinebetriebe nicht nur auf *C. ulcerans*, sondern auch auf die anderen Erreger der „*C. diphtheriae* Gruppe“, *C. diphtheriae* und *C. pseudotuberculosis*, untersucht werden.

Ziel der vorliegenden Studie ist die Evaluierung der nasalen *Corynebacterium*-Flora des Schweines unter besonderer Berücksichtigung von toxinproduzierenden Spezies in bayerischen Schweinebeständen sowie der nasalen *Corynebacterium*-Flora der Landwirte. Zusätzlich sollten die Isolate mittels MALDI-TOF MS charakterisiert und die Ergebnisse mit API Coryne und 16S rDNA-Sequenzierung verglichen und bestätigt werden. Die Resultate sollen einen Überblick über die nasale *Corynebacterium*-Flora des Schweines geben und einen Beitrag zur Risikoabschätzung der Übertragung von Diphtherie-Erregern von Schweinen auf den Menschen liefern.

2 Literaturübersicht

2.1 *Corynebacterium* spp.

2.1.1 Taxonomie

Das Genus *Corynebacterium* gehört zur Familie Corynebacteriaceae der Ordnung Actinomycetales der Klasse Actinobacteria (SELBITZ 2007). Der Gattungsname „*Corynebacterium*“ entstammt dem griechischen Wort „coryne“ für Keule und verweist auf die keulenartige Form der Zellen (FUNKE und BERNARD 2007; SELBITZ 2007). Im Sinne eines rein morphologisch-deskriptiven Überbegriffs werden grampositive, keulenförmige Stäbchenbakterien ungeachtet ihrer genauen taxonomischen Einordnung auch als „coryneform“ bezeichnet.

Das Genus umfasst Mikroorganismen mit sehr diversen Eigenschaften (TAUCH 2008). Eine systematisch-taxonomische Einteilung der coryneformen Bakterien besteht seit dem Jahr 1981 (FUNKE et al. 1997a). Umfasste das Genus *Corynebacterium* im Jahr 2007 noch 67 Spezies und zwei namenlose Taxa, wovon 40, inklusive dieser zwei Taxa, als medizinisch relevant galten (FUNKE und BERNARD 2007), so sind inzwischen mehr als 70 Spezies taxonomisch klassifiziert (TAUCH 2008).

Zusammen mit der Gattung *Turicella* sind Corynebakterien mit den Genera *Mycobacterium* und *Nocardia* näher verwandt als alle anderen coryneformen Bakterien (PODBIELSKI et al. 2010).

2.1.2 Morphologie

Corynebacterium spp. und andere coryneforme Stäbchen sind nicht sporenbildende, irregulär geformte Stäbchen mit grampositivem Färbeverhalten, wobei die Bildung metachromatischer Granula oft zu unregelmäßiger Anfärbung führt.

Echte Corynebakterien sind leicht gebogen und weisen keulenartig (griech.: coryne) aufgetriebene Enden auf. Ausnahmen bilden *C. durum*, *C. matruchotii* und *C. sundsvallense* mit eher filamentösem Aussehen.

Im mikroskopischen Bild ist eine Lagerung in Paaren, V - oder palisadenförmig (ähnlich chinesischen Schriftzeichen) zu sehen, die ihre Ursache in Besonderheiten bei der Zellteilung hat. Diese auch als snapping division bezeichnete Zellteilung resultiert aus dem seitlichen Verbundenbleiben vor der eigentlichen Teilung (SELBITZ 2007; FUNKE 2009).

2.1.3 Kulturmorphologie

Corynebacterium spp. reichen einfache Nährmedien für ihr Wachstum aus. Der Zusatz von tierischem Eiweiß und eine mikroaerophile Inkubation unter 5% CO₂-Spannung wirken jedoch deutlich stimulierend.

Innerhalb von 48 Stunden Inkubationszeit wachsen praktisch alle relevanten Corynebakterien und coryneforme Bakterien bei einem Temperaturoptimum von 35 – 37 °C.

Eine erste präsumtive Identifizierung erfolgt anhand der Kulturmorphologie, der Koloniegröße, -farbe und dem Hämolyseverhalten (siehe Tabelle 1) sowie einfacher biochemischer Parameter (siehe 2.1.4) (FUNKE und BERNARD 2007).

Tabelle 1 zeigt kulturmorphologische Besonderheiten einiger ausgewählter coryneformer Bakterien.

Tabelle 1: Morphologie ausgewählter coryneformer Bakterien modifiziert nach FUNKE und BERNARD (2007)

Taxon	Größe in mm	Farbe	Hämolyse	Koloniemorphologie
<i>C. diphtheriae</i> Biovar <i>gravis</i> , <i>mitis</i> und <i>belfanti</i>	bis zu 2	weiß	k. A.*	zum Teil matt
<i>C. diphtheriae</i> Biovar <i>intermedius</i>	klein	grau	k. A.	zum Teil glasig
<i>C. pseudotuberculosis</i>	1	gelblich - weiß	evtl. leichte	matt, erhaben
<i>C. ulcerans</i>	1 - 2	grau - weiß	leichte	trocken, wachsartig
<i>C. amycolatum</i>	1 - 2	gräulich - weißlich	k. A.	trocken, wachsartig, unregelmäßiger Rand
<i>C. glucuronolyticum</i>	1 - 1,5	weißlich - gelblich	keine	erhaben, cremig
<i>C. jeikeium</i>	0,5 - 1	gräulich - weiß	keine	leicht erhaben, glatter Rand
<i>C. propinquum</i>	1 - 2	weißlich	keine	trocken, matte Oberfläche, glatter Rand
<i>C. xerosis</i>	1 - 1,5	gelblich	k. A.	trocken, körnig, unregelmäßiger Rand
<i>Turicella otitidis</i>	1 - 1,5	weißlich	k. A.	erhaben, cremig, glatter Rand
<i>Brevibacterium spp.</i>	≥ 2	weißlich – gräulich oder gelblich	k. A.	erhaben, meist cremig, glatte, glänzende Oberfläche
<i>Cellulomonas spp.</i>	0,5 - 1,5	farblos, weißlich oder hellgelb	k. A.	erhaben, cremig, glatter Rand
<i>Microbacterium spp.</i>	k. A.	blass- bis hellgelb bis orange	k. A.	k. A.

*k. A.: keine Angabe

2.1.4 Biochemische Eigenschaften

Zur biochemischen Identifizierung und Differenzierung coryneformer Bakterien können bestimmte charakteristische Stoffwechselfparameter genutzt werden:

Echte Corynebakterien sind Katalase-positiv. Andere coryneforme Bakterien wie *Arcanobacterium spp.* und *Gardnerella spp.* produzieren keine Katalase oder sind variabel in ihrer Katalaseproduktion wie beispielsweise *Microbacterium spp.* (FUNKE und BERNARD 2007).

Laut FUNKE et al. (1997a) sollen zur ersten Differenzierung coryneformer Bakterien neben der Katalaseproduktion auch weitere biochemische Reaktionen untersucht werden. Grund dafür ist, dass schon alleine an der Variabilität der biochemischen Eigenschaften erste Speziesdifferenzierungen durchgeführt werden können. Beispielsweise umfasst das Genus *Corynebacterium* sowohl fermentative als auch oxidative Stämme und auch die Ureaseproduktion kann zwischen den einzelnen Spezies variieren. Demnach sollten die ersten Untersuchungen folgende Schlüsselreaktionen enthalten: fermentativer oder oxidativer Metabolismus, Nitratreduktion, Ureaseproduktion, Säurebildung aus Glukose, Maltose, Saccharose, Mannitol und Xylose und den CAMP-Test.

Wichtige biochemische Reaktionen einer Auswahl relevanter coryneformer Bakterien sind nachfolgend in Tabelle 2 und Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 2: Identifizierung klinisch relevanter *Corynebacterium* spp. nach FUNKE und BERNARD (2007)

Spezies	Fermentation/ Oxidation	Nitrat- reduktion	Urease	Esculin- hydrolyse	Pyrazin- amidase	Säurebildung aus:					CAMP- Test	Lipophilie
						Glukose	Maltose	Saccharose	Mannitol	Xylose		
<i>C. diphtheriae</i> <i>Biovar gravis</i>	F	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>C. diphtheriae</i> <i>Biovar intermedius</i>	F	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
<i>C. diphtheriae</i> <i>Biovar mitis</i> und <i>belfanti</i>	F	+/- *	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>C. pseudo- tuberculosis</i>	F	V	+	-	-	+	+	V	-	-	REV	-
<i>C. ulcerans</i>	F	-	+	-	-	+	+	-	-	-	REV	-
<i>C. amycolatum</i>	F	V	V	-	+	+	V	V	-	-	-	-
<i>C. glucuronolyticum</i>	F	V	V	V	+	+	V	+	-	V	+	-
<i>C. jeikeium</i>	O	-	-	-	+	+	V	-	-	-	-	+
<i>C. propinquum</i>	O	+	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. xerosis</i>	F	V	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-

Abkürzungen und Symbole: Fermentation (F); Oxidation (O); positiv (+); negativ (-); Reaktion variabel (V); reverse CAMP-Reaktion (REV)

* *C. diphtheriae* Biovar *mitis* ist Nitratreduktase-positiv, *C. diphtheriae* Biovar *belfanti* ist Nitratreduktase-negativ

Tabelle 3: Identifizierung klinisch relevanter coryneformer Bakterien nach FUNKE und BERNARD (2007)

Genus	Fermentation/ Oxidation	Nitratreduktion	Urease	Esculin- hydrolyse	Säurebildung aus:					CAMP- Test	Katalase
					Glukose	Maltose	Saccharose	Mannitol	Xylose		
<i>Turicella otitidis</i>	O	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Brevibacterium spp.</i>	O	V	-	-	V	V	V	-	-	-	+
<i>Cellulomonas spp.</i>	F	+	-	+	+	+	+	V	+	-	+
<i>Microbacterium spp</i>	F/O	V	V	V	+	+	V	V	V	-	V
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	F	-	-	V	+	V	V	V	+	-	-
<i>Gardnerella vaginalis</i>	F	-	-	-	+	+	V	-	-	-	-

Abkürzungen und Symbole: Fermentation (F); Oxidation (O); positiv (+); negativ (-); Reaktion variabel (V)

2.2 Toxinproduzierende *Corynebacterium* spp.

2.2.1 Allgemeines

Die pathogenetisch bedeutendsten *Corynebacterium* spp. sind Teil der so genannten „*C. diphtheriae* Gruppe“ und beinhalten die Spezies *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* und *C. pseudotuberculosis*. Der Grund für diese Einteilung ist die Fähigkeit dieser drei Spezies als Virulenzfaktor ein Toxin-Gen (*tox*-Gen) zu tragen, welches ein Diphtherie verursachendes Exotoxin kodiert (PASCUAL et al. 1995; RIEGEL et al. 1995; RUIMY et al. 1995).

C. diphtheriae wird in vier Biovare unterteilt: *gravis*, *mitis*, *belfanti* und *intermedius*. Die Unterscheidung dieser Biovare erfolgt anhand verschiedener Kriterien wie z. B. der Zuckerfermentations-Reaktion und Koloniemorphologie (PODBIELSKI et al. 2010). Laut KRECH (1994) kann das *C. diphtheriae* Biovar *intermedius* anhand der Form der Kolonien von den anderen Biovaren unterschieden werden (vgl. Tabelle 1).

C. ulcerans und *C. pseudotuberculosis* lassen sich durch ihre Ureaseproduktion und den reversen CAMP-Test von *C. diphtheriae* abgrenzen (FUNKE et al. 1997a; FUNKE und BERNARD 2007) (siehe auch Tabelle 2). Eine nahe Verwandtschaft zwischen *C. ulcerans* und *C. pseudotuberculosis* wird aufgrund der Tatsache vorgeschlagen, dass sie als einzige unter den Corynebakterien Phospholipase D produzieren und eine hohe Homologie in der 16S rDNA aufweisen (GROMAN et al. 1984; BUCK et al. 1985).

2.2.2 Virulenzfaktoren

2.2.2.1 Diphtherie-Toxin

Wichtigster Virulenzfaktor der „*C. diphtheriae* Gruppe“ ist ein potentes 58-kDa schweres A/B-Exotoxin, das aus 535 Aminosäuren besteht. Es weist zwei funktionell unterschiedliche Polypeptidketten auf: A und B. B bindet an Zielzellen, die sich bevorzugt im Nasopharynx, aber auch im Myokard oder in Nervengewebe befinden können und die entsprechenden Rezeptoren für diese Bindung aufweisen. Die aktive Wirkkomponente A steht für die toxische Aktivität. Dazu blockiert A irreversibel die Translation der Proteinbiosynthese in intakten Säugerzellen, die daraufhin absterben (KAYSER et al. 2005; FUNKE 2009).

Das Diphtherie-Toxin-Gen (DT-Gen) ist phagencodiert. Nicht-toxigene Stämme dieser Gruppe können durch Aufnahme lysogener, Toxin-positiver Phagen die Fähigkeit, DT zu produzieren, erwerben (PODBIELSKI et al. 2010).

2.2.2.2 Phospholipase D

Die Phospholipase D (PLD) ist ein membranschädigendes Toxin, das von *C. pseudotuberculosis* produziert wird und als sein wichtigster Virulenzfaktor gilt (LIPSKY et al. 1982; HODGSON et al. 1992; TROST et al. 2010b). Auch *C. ulcerans* und *Arcanobacterium haemolyticum* produzieren ein ähnliches Toxin (CUEVAS und SONGER 1993; MCNAMARA et al. 1995; SETO et al. 2008; DIAS et al. 2010).

Laut CUEVAS und SONGER (1993) weisen die PLD Gene und Genprodukte von *C. pseudotuberculosis* und *C. ulcerans* eine 65%ige DNA Homologie auf. Nach MCNAMARA et al. (1995) teilen sie mit der Phospholipase D von *Arcanobacterium haemolyticum* Übereinstimmungen in der DNA- und Aminosäuren-Sequenz von 64% bis 97%. Daher ist es nicht unwahrscheinlich, dass dieses hoch konservierte Enzym einen Virulenzfaktor darstellt.

Die PLD wirkt als Permeabilitätsfaktor, indem sie die Esterbindungen der Sphingomyeline in der Membran von Säugerzellen hydrolysiert. Phosphocholin und Ceramid entstehen als Spaltprodukte und lösen als Second messenger intrazelluläre Signalkaskaden aus (DORELLA et al. 2006; ROLLE und MAYR 2007a). Dadurch wird die Erregerausbreitung im Wirt ermöglicht und Hautnekrosen verursacht. Bei verschiedenen Labor- und Haustierarten kann bei Gabe höherer Dosen auch eine tödliche Wirkung beobachtet werden (LIPSKY et al. 1982; EGEN et al. 1989; COYLE und LIPSKY 1990; SONGER 1997).

2.3 Epidemiologie der Corynebakterien

2.3.1 Vorkommen und Bedeutung beim Schwein

Die Pathogenität vieler Corynebakterien und coryneformer Bakterien ist für das Schwein nicht geklärt. Eventuell können diese als fakultativ pathogene Keime durch vermehrtes Auftreten oder Eindringen in den Körper bei Erkrankungen mitbeteiligt sein.

DEVRIESE et al. (2000) isolieren *C. glucuronolyticum* sowohl aus Proben von kranken Sauen mit pathologischem Vaginalausfluss als auch aus Sperma klinisch gesunder Eber, so dass die klinische Relevanz für Schweine unbekannt bleibt.

Im Jahr 2003 wird in Proben von Schweinen ein neues *Corynebacterium* entdeckt: *C. suicordis*. Dabei wird der Erreger in pathologisch verändertem Material des Perikards, der Pleura und der Lungen gefunden. Signifikante Assoziationen für *C. suicordis* mit Erkrankungen können bisher jedoch nicht festgestellt werden, da der Keim nur in seltenen Fällen alleine isoliert wird. In dieser Studie werden als Begleitflora beispielsweise

Streptococcus spp., *Haemophilus parasuis* oder *Pasteurella multocida* isoliert, wobei *C. suis* im Bezug zu den Begleitkeimen nicht immer dominiert (VELA et al. 2003).

Eindeutige Rückschlüsse auf einen pathogenen Charakter von *C. xerosis* für Schweine können VELA et al. (2006) nicht ziehen. Ihnen gelingt der Nachweis des Erregers aus Gelenken von Schweinen mit Arthritis und Abszessen, mit subkutanen Abszessen, Nierengewebe von Schweinen mit Atemwegsproblemen, Lungengewebe bei Schweinen mit Verdacht auf Rotlauf und auch aus Blut plötzlich verendeter Schweine. Obwohl der Nachweis in den meisten Fällen für *C. xerosis* als alleiniger Keim möglich ist, wird er dennoch in einigen Fällen zusammen mit anderen veterinärmedizinischen Pathogenen wie *Streptococcus suis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* oder *Mycoplasma hyosynoviae* isoliert, was es schwierig macht die mögliche Pathogenität für Schweine und andere Tiere zu belegen (VELA et al. 2006). PALACIOS et al. (2010) halten es für möglich, dass *C. xerosis* eine größere veterinärmedizinische Relevanz hat als bisher vermutet. In ihrer Studie beschreiben sie die Möglichkeiten zur besseren Erkennung und Identifizierung dieses Keimes aus klinischen Proben, unter anderem an Hand von neun Proben aus Leber, Niere, Milz, Blut, Gelenken und Föten von Schweinen, mittels biochemischer und molekularbiologischer Verfahren und erhoffen sich daraus auch eine bessere Kenntnis seiner Verbreitung und Relevanz als Pathogen im Tierreich (PALACIOS et al. 2010).

Arcanobacterium pyogenes (*Corynebacterium pyogenes*, *Actinomyces pyogenes* (SKERMAN et al. 1980; REDDY et al. 1982)) besiedelt die Haut und Schleimhäute gesunder Tiere, ist aber auch als ein bedeutendes Pathogen bei Schweinen bekannt. So kann *A. pyogenes* bei Abszessbildungen infolge von Wundinfektionen beteiligt sein und neben Staphylokokken- und Streptokokken-Arten als Eitererreger auch im Vordergrund bei akuten und chronischen Mastitiden stehen. Eintrittspforte sind häufig Bissverletzungen des Gesäuges durch die Ferkel. Meist sind dabei nur einzelne oder ein einziger Mammarkomplex betroffen (SCHNURRBUSCH 2006a; CHRISTENSEN et al. 2007; ROLLE und MAYR 2007b).

Durch hämatogene Streuung von *A. pyogenes* aus Abszessen kann dieses coryneforme Bakterium auch an Endokarditiden, vor allem an den Herzklappen, bei Schweinen beteiligt sein oder sie verursachen (WOUDA et al. 1987; HEINRITZI 2006b).

Auch aus Gelenken wird *A. pyogenes* isoliert, wenn es infolge hämatogener Streuung oder gelenksnaher Verletzungen in den Gelenken neben anderen Eitererregern wie Streptokokken und Staphylokokken mitverantwortlich für eitrige Arthritiden ist (TURNER 1982; HEINRITZI 2006a).

SCHNURRBUSCH (2006b) sieht *A. pyogenes* bei Ebern auch als Erreger für Schleimhautentzündungen des Präputiums an. In diesem Falle oder anderen unspezifischen Entzündungen der Genitalorgane ist dieser Keim auch in der Flora des Spermas anzutreffen.

Ein weiteres bei Schweinen auftretendes coryneformes Bakterium mit pathogener Bedeutung ist *Actinobaculum suis* (*Corynebacterium suis*, *Eubacterium suis*, *Actinomyces suis* (WEGIENEK und REDDY 1982; LUDWIG et al. 1992; LAWSON et al. 1997)).

Actinobaculum suis ist der Erreger der Aktinomykose der Schweine, welche durch knotig derbe Granulome in der Subkutis hauptsächlich am Gesäuge weiblicher Tiere, seltener in der Mundhöhle gekennzeichnet ist. Diese Granulome neigen zur Bildung von Fisteln, aus denen sich abgestorbenes Gewebe, Eiter und Erregerdrusen entleeren. Der aus den Fisteln austretende Eiter ist infektiös und begünstigt die rasche Ausbreitung der Krankheit in Sauherden, weshalb sofort Maßnahmen zur Eindämmung unternommen werden sollten: Gabe geeigneter Antibiotika wie Penicillin, Sulfonamide oder Erythromycin über 20 Tage, chirurgische Entfernung größerer Knoten oder die Beseitigung betroffene Tiere aus der Herde (HEINRITZI 2006c).

Bei gesunden Ebern besiedelt *Actinobaculum suis* den Präputialsack: erst beim Deckakt erfolgt die Infektion der Sau (PIJOAN et al. 1983; JONES und DAGNALL 1984; ROLLE und MAYR 2007b). Neben Zystitiden und Pyelonephritiden kann *Actinobaculum suis* bei den weiblichen Tieren auch zu Aborten und in schweren Fällen auch zum Tod führen (WENDT et al. 1990; PLESCHAKOWA et al. 2004; ROLLE und MAYR 2007b; ALMANJD und BILKEI 2008).

2.3.2 Vorkommen und Bedeutung toxinproduzierender *Corynebacterium* spp. beim Schwein

SCHUHEGGER et al. (2009) vermuten, dass der Umgang mit *C. ulcerans* infizierten Schweinen zu Diphtherie-ähnlichen Erkrankungen beim Menschen führen kann. Grund ihrer Vermutung ist das Resultat einer Umgebungsuntersuchung im Zuge einer an Diphtherie erkrankten Landwirtin. Hierfür werden drei Familienmitglieder, 19 klinisch unauffällige Schweine des Betriebes und der Hofhund beprobt. Dabei konnte bei einem der klinisch unauffälligen Schweine ein *C. ulcerans* Stamm isoliert werden, der eine 100%ige Übereinstimmung in der *rpoB*-Sequenz und dem Diphtherie-Toxin-Gen mit dem von der Landwirtin isolierten *C. ulcerans* Stamm aufweist.

2011 berichten CONTZEN et al. (2011) von zwei Wildschweinen mit käsiger Lymphadenitis: bei beiden Tieren werden *C. ulcerans* Stämme isoliert. Sowohl das *tox*-Gen als auch die Produktion von Phospholipase D wird bei beiden Stämmen nachgewiesen, jedoch keine

Diphtherie-Toxin-Produktion. Anhand dieses Ergebnisses nehmen CONTZEN et al. (2011) an, dass Wildschweine als mögliches Reservoir für *C. ulcerans* dienen.

Aufgrund der von SCHUHEGGER et al. (2009) vermuteten und in anderer Literatur vermuteten bzw. nachgewiesenen Übertragung von *C. ulcerans* von Tieren auf den Menschen schließen CONTZEN et al. (2011), dass dieses Pathogen zu den Zoonoseerregern zählt (DE ZOYSA et al. 2005; LARTIGUE et al. 2005; HOGG et al. 2009; BERGER et al. 2011).

C. pseudotuberculosis, das ebenfalls das Diphtherie-Toxin produzieren kann, wird von ZHAO et al. (1993) aus Zervixproben klinisch unauffälliger Sauen isoliert. Der Nachweis dieses Keimes bei gesunden Schweinen lässt jedoch keine Aussage über die medizinische Relevanz dieses Mikroorganismus für Schweine zu.

Die Bedeutung und das Vorkommen von *C. diphtheriae* Stämmen bei Schweinen ist noch unklar. Als einzig relevantes Erregerreservoir gilt der Mensch (FUNKE et al. 1997a; PODBIELSKI et al. 2010).

2.3.3 Vorkommen und Bedeutung beim Menschen

Corynebakterien sind Bestandteil der natürlichen Flora auf Haut und Schleimhäuten des Menschen. Dabei sind nicht alle Spezies ubiquitär vorhanden.

So sind beispielsweise *C. durum* und *Rothia dentocariosa* hauptsächlich in der Mund- und Rachenhöhle zu finden. VON GRAEVENITZ et al. (1998) belegen dies durch eine Untersuchung von 113 Rachentupfern gesunder Personen, in denen sie zu 76% diese beiden Erreger finden.

HOLZMANN et al. (2002) sind der Meinung, dass *C. auris* und *Turicella otitidis* nicht nur Erreger von Mittelohrentzündungen sein können, sondern möglicherweise auch Teil der normalen Flora des Gehörganges sind. Ihre Vermutung basiert auf der Probenuntersuchung von Kindern mit und ohne Mittelohrentzündung, bei der sie sowohl im Gehörgang erkrankter als auch gesunder Kinder diese Erreger isolieren konnten und sie zudem feststellten, dass nicht bei allen Mittelohrentzündungen *C. auris* und *Turicella otitidis* beteiligt waren.

In ophthalmologischen Abstrichen wie beispielsweise Konjunktivaltupfern bei Konjunktivitis kann in den meisten Fällen *C. macginleyi* nachgewiesen werden (FUNKE et al. 1998). Bemerkenswert ist, dass diese und andere coryneforme Bakterien nicht nur Teil der physiologischen Haut- und Schleimhautflora sind, sondern dass viele auch opportunistische Krankheitserreger sein können (FUNKE und BERNARD 2007; OLENDER und LETOWSKA 2010).

Im Folgenden soll daher ein kurzer Überblick über die mögliche Pathogenität einiger Genera bzw. Spezies gegeben werden:

Atoxigene *Corynebacterium spp.* der „*C. diphtheriae* Gruppe“, die nicht mit toxischen Bakteriophagen lysogeniert sind, werden immer häufiger als Krankheitserreger beobachtet. Diese Stämme verursachen dabei in seltenen Fällen lokale Läsionen und werden zunehmend als Ursache für infektiöse Bakteriämien und Endokarditiden gesehen (PODBIELSKI et al. 2010).

Corynebacterium amycolatum ist Teil der physiologischen Hautflora des Menschen, kann aber dennoch auch mit Krankheiten assoziiert sein. So ermitteln MARTINS et al. (2009) bei krebserkrankten Patienten mit Infektionen des Harntrakts, von postoperativen Wunden, den unteren Atemwegen sowie vereiterten Tumoren in Folge einer *Corynebacterium spp.* Infektion als häufigsten Erreger *C. amycolatum*. Auch bei immunsupprimierten, an Krebs erkrankten Kindern wird in einer Studie von ADDERSON et al. (2008b) als häufigster Erreger *C. amycolatum* isoliert. Anderen Berichten zufolge, kann *C. amycolatum* auch in klinischen Proben wie Wundinfektionen als vorrangige *Corynebacterium sp.* nachgewiesen werden, wobei in einigen Fällen das Auffinden dieses Mikroorganismus nicht eindeutig auf eine klinische Signifikanz als Erreger schließen lässt (LAGROU et al. 1998; OLENDER und LETOWSKA 2010). DALAL et al. (2008) beschreiben einen der seltenen Fälle einer durch *C. amycolatum* verursachten Endokarditis mit sonographisch und auskultatorisch darstellbaren Veränderungen an den Mitralklappen.

Laut SCHÜTT-GEROWITT und BEUTH (2001) kann *C. xerosis* bei immunsupprimierten Menschen der Grund für eine Sepsis oder Endokarditis sein. Als Ausgangspunkt für Infektionen sehen sie dabei die Besiedelung von Kathetern oder anderen Plastikmaterialien mit diesem Mikroorganismus. FUNKE et al. (1996) vermuten jedoch, dass *C. xerosis* in vielen bisher veröffentlichten Berichten falsch identifiziert wurde und eigentlich *C. amycolatum* entspricht. Beweggrund für ihre Annahme ist eine Studie, in der ursprünglich als *C. xerosis* identifizierte Stämme bei erneuter biochemischer und molekularbiologischer Untersuchung als *C. amycolatum* identifiziert werden konnten.

C. aurimucosum besiedelt normalerweise den menschlichen Darm, möglicherweise ist es jedoch auch ein Pathogen des weiblichen Genitaltraktes. So konnte dieser Keim bei Frauen nach einem spontanen Abort aus vaginalen Abstrichen isoliert werden. Aber auch andere Schwangerschaftskomplikationen, die zum Zeitpunkt der Erregerisolation auftreten, wie Frühwehen oder reduziertes Volumen der Amnionflüssigkeit, werden mit *C. aurimucosum* assoziiert (SHUKLA et al. 2003a; SHUKLA et al. 2003b; TROST et al. 2010a).

Brevibacterium spp. zählen als coryneforme Bakterien ebenfalls zur Normalflora der Haut, können aber auch mit Krankheiten assoziiert werden. OLENDER und LETOWSKA (2010)

beispielsweise isolieren in einer Studie über Wundinfektionen infolge opportunistischer *Corynebacterium spp.* neben anderen Corynebakterien wie z. B. *C. amycolatum*, *C. striatum* und *C. jeikeium* auch *Brevibacterium spp.*. BRAZZOLA et al. (2000) berichten von *Brevibacterium casei* als Ursache für eine Sepsis bei einem immunsupprimierten HIV-Patienten und CANNON et al. (2005) isolieren denselben Keim aus Proben eines Patienten mit Perikarditis. Ein weiterer opportunistischer Krankheitserreger der Spezies *Brevibacterium* ist das *Brevibacterium otitidis*. Bisher war dieser Mikroorganismus nur bei Ohrinfektionen anzutreffen, WAUTERS et al. (2000) berichten allerdings von einer durch *Brevibacterium otitidis* hervorgerufenen Peritonitis.

In Tabelle 4 sind weitere, häufig berichtete Erkrankungen bei Menschen aufgelistet, die mit coryneformen Bakterien assoziiert werden können.

Tabelle 4: Coryneforme Bakterien als Krankheitserreger und beteiligte Erreger von Krankheiten
modifiziert nach FUNKE und BERNARD (2007)

Taxon	assoziierte Erkrankungen	Referenzen
<i>C. glucuronolyticum</i>	Urogenitaltraktinfektionen	FUNKE et al. (1995a)
<i>C. jeikeium</i>	Endokarditis, Bakteriämien, Wundinfektionen	RIEGEL et al. (1994)
<i>C. minutissimum</i>	Wundinfektionen, Harnwegsinfektionen, Respiratorische Infektionen	ZINKERNAGEL et al. (1996)
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	Respiratorische Infektionen, Endokarditis	FUNKE und BERNARD (2007)
<i>C. urealyticum</i>	Harnwegsinfektionen, Bakteriämien, Wundinfektionen	SORIANO et al. (1990)
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	Abszesse, Wund- und Weichteilinfektionen	FUNKE und BERNARD (2007)
<i>Cellulomonas spp.</i>	Wundinfektionen, Bakteriämien	BROWN et al. (2005) FUNKE et al. (1995b)
<i>Rothia spp.</i>	Endokarditis, Bakteriämien, Respiratorische Infektionen	FUNKE und BERNARD (2007)

2.3.4 Vorkommen und Bedeutung toxinproduzierender *Corynebacterium* spp. beim Menschen

Die wohl bedeutendste Erkrankung des Menschen, die durch *Corynebacterium* spp. verursacht wird, ist die Diphtherie. Erreger ist *C. diphtheriae* mit den vier Biovarien *gravis*, *mitis*, *belfanti* und *intermedius*. Der Mensch ist das einzig relevante Erregerreservoir.

Die Virulenz besteht hauptsächlich in der Fähigkeit, ein potentes Exotoxin, das Diphtherie-Toxin, zu produzieren. Dazu muss der Erreger Träger des Diphtherie-Toxin-Gens (*tox*-Gen) sein, das auf lysogenen Phagen kodiert ist (siehe auch 2.2.1.1) (FUNKE et al. 1997a; PODBIELSKI et al. 2010).

Die Keime werden durch Tröpfchen- oder Schmierinfektion übertragen und nach einer Inkubationszeit von 2-5 Tagen können je nach Manifestationsort verschiedene Krankheitsbilder auftreten (HOF und DÖRRIES 2004).

Klassische Formen sind die Respirationstrakt-Diphtherie und die Haut-Diphtherie. Die Respirationstrakt-Diphtherie führt neben uncharakteristischen grippeähnlichen Symptomen zu einer harten (griech.: diphthera, Lederhaut), adhärenenten, charakteristischen Pseudomembran im Bereich des Nasopharynx. Grund dafür ist die irreversible Hemmung der Translation der Proteinsynthese in intakten Säugerzellen durch das Diphtherie-Toxin, was zu deren Zelltod und als Folgeerscheinung zu Gewebse Nekrosen führt (KAYSER et al. 2005; FUNKE und BERNARD 2007; FUNKE 2009).

Neben den lokal begrenzten Formen kann es bedingt durch Dissemination des Exotoxins zu Folgeerkrankungen wie Neuritis und Myokarditis kommen. Selten kann diese sekundär toxische Diphtherie auch zu Nekrosen der Nierentubuli und Hepatomegalie führen (HOF und DÖRRIES 2004; FUNKE 2009).

Die Diphtherie des Integuments äußert sich durch chronische Geschwüre. Anzeichen einer systemischen Intoxikation wie bei der Respirationstrakt-Diphtherie aufgrund einer hämatogenen Streuung werden in diesem Fall so gut wie nicht beobachtet. Hautinfektionen können auch durch Toxin-negative Stämme auftreten (SING und HEESEMANN 2005; FUNKE und BERNARD 2007; FUNKE 2009).

Zu der „*C. diphtheriae* Gruppe“ zählen auch die zoonotischen Erreger *C. pseudotuberculosis* und *C. ulcerans*, von denen einige Stämme ebenfalls in der Lage sind Diphtherie-Toxin zu produzieren. Auch bei diesen beiden Keimen ist die Toxin-Produktion abhängig von der Aufnahme von Bakteriophagen, die das *tox*-Gen auf ihrem Genom tragen. *C. pseudotuberculosis* und *C. ulcerans* sind so in der Lage, ein Diphtherie-ähnliche Krankheitsbild hervorzurufen (FUNKE et al. 1997a; PODBIELSKI et al. 2010).

Therapeutisch ist bereits bei klinischer Verdachtsdiagnose die Gabe von Antitoxin und Antibiotika induziert. Dabei sind Penicilline und Erythromycin Mittel der Wahl, aber auch Tetrazyklin, Rifampicin und Clindamycin sind wirksam. Eine Antibiotikaresistenztestung ist jedoch anzuraten, da für Penicillin und Erythromycin vereinzelt Resistenzen bekannt sind und *C. diphtheriae* Stämme bereits eine plasmidkodierte Resistenz gegen Erythromycin aufweisen können (TAUCH et al. 2003; PODBIELSKI et al. 2010).

Prophylaktisch besteht die Möglichkeit einer aktiven Immunisierung mit einem Toxoid-Impfstoff, die aber nicht gegen eine Infektion bzw. Kolonisation schützt, sondern nur gegen die Toxinwirkung (PODBIELSKI et al. 2010).

Aufgrund der von SING et al. (2003) festgestellten Unterschiede der Basenzusammensetzung in den Diphtherie-Toxin-Genen von *C. diphtheriae* und *C. ulcerans*, insbesondere im Bereich der Translokations- und Rezeptorbindungsstellen, erwägen SCHUHEGGER et al. (2008b), dass eine Prävention mit *C. diphtheriae* Toxoid nicht in allen Fällen gegen das *C. ulcerans* Diphtherie-Toxin schützen könnte.

2.4 Nachweis von Corynebakterien

2.4.1 Kulturelle Methoden

2.4.1.1 Anzucht

Coryneforme Bakterien können auf Blutagar mit 5% Schafblut einfach angezüchtet werden. Zur besseren Selektion können Fosfomycin-haltige Blutagarplatten oder Testplättchen zum Auflegen verwendet werden, da bis auf *Actinomyces spp.* und das coryneforme Bakterium *Dermabacter hominis* sämtliche Coryneformen resistent gegen Fosfomycin sind.

Für den Nachweis lipophiler Corynebakterien wie *C. jeikeium* oder *C. urealyticum* ist die Zugabe von Emulgatoren, beispielsweise Tween 80, zu empfehlen. Diese Hilfsstoffe begünstigen das Größenwachstum der Kolonien lipophiler Corynebakterien, die daraufhin besser beurteilt werden können (FUNKE 2009).

WILSON et al. (1992) empfehlen das Selektivmedium von Hoyle, einen tellurithaltigen Agar. Kalium-Tellurit hemmt das Wachstum von gramnegativen und einer Vielzahl grampositiver Bakterien und erlaubt den Nachweis der Telluritreduktion durch die Schwarzfärbung der Kolonien. Zu beachten ist jedoch, dass diese Fähigkeit nicht spezifisch für Corynebakterien ist, sondern viele andere coryneforme Bakterien und auch nicht-coryneforme Keime, wie z. B. koagulasepositive Staphylokokken ebenfalls die Fähigkeit zur Telluritreduktion aufweisen.

Für die „*C. diphtheriae* Gruppe“ werden auch Selektivmedien mit Cystin herangezogen. Dieses Medium zeigt die Cystinase-Aktivität der Corynebakterien durch braune Höfe um die

Kolonien an. Gerne werden auch Tinsdale-Platten speziell für den Nachweis der Diphtherie-Erreger herangezogen, da sie sowohl die Telluritreduktion durch die schwarzen Kolonien als auch die Cystinase-Aktivität durch braune Koloniehöfe anzeigen (EFSTRATIOU und GEORGE 1999; EFSTRATIOU et al. 2000; FUNKE und BERNARD 2007).

Das Wachstumsoptimum aller coryneformen Bakterien liegt bei 35 – 37 °C. Ausnahmen bilden einige *Arthrobacter* und *Microbacterium* spp. mit einem Wachstumsoptimum von 30 °C. Zur weiteren Verbesserung des Wachstums bietet sich die mikroaerophile Inkubation unter 5%iger CO₂-Spannung an, da Isolate einiger Taxa wie zum Beispiel *Rothia* und *Arcanobacterium* spp. unter diesen Bedingungen besser wachsen. (FUNKE und BERNARD 2007).

2.4.1.2 Gram-Färbung

Corynebacterium spp. zeigen in Gram-Präparaten grampositive Stäbchen. Aufgrund der Bildung metachromatischer Granula sind aber auch häufig Unregelmäßigkeiten in der Anfärbung zu erkennen. Nur echte Corynebakterien weisen in Gram-Präparaten die typischen keulenartigen (griech.: coryne) Strukturen der leicht gebogenen Stäbchen auf. Eine Ausnahme bilden *C. durum*, *C. matruchotii* und *C. sundsvallense* mit eher filamentösem Aussehen (SELBITZ 2007; FUNKE 2009).

2.4.2 Biochemische Differenzierung

Die Katalaseaktivität von *Corynebacterium* spp. sollte immer zur Identifizierung und Differenzierung herangezogen werden, da *Corynebacterium* spp. immer Katalase-positiv sind. Innerhalb des Genus *Corynebacterium* können fermentative und nicht-fermentative Arten unterschieden werden. Die Überprüfung des fermentativen bzw. oxidativen Stoffwechsels wird am besten in Cystin-Trypticase-Agar-Medium getestet. Dabei weist ein Farbumschlag im ganzen Röhrchen durch Säurebildung oder Alkalisierung auf eine Fermentation hin, wohingegen bei einer Oxidation der Farbumschlag nur an der Oberfläche zu beobachten ist (HOLLIS und WEAVER 1981; FUNKE 2009).

Der CAMP-Test und der reverse CAMP-Test können zur Identifizierung einiger *Corynebacterium* spp. herangezogen werden. Für diese Tests wird ein Hämolytin-bildender *Staphylococcus aureus* Stamm strichförmig auf eine Schafblutagarplatte aufgeimpft. Im positiven CAMP-Test wird die Hämolyse des zu untersuchenden Stammes verstärkt, der ebenfalls strichförmig im rechten Winkel zum *Staphylococcus aureus* Stamm aufgeimpft wird. Es zeigt sich dabei im Bereich des Aufeinandertreffens beider Stämme eine Triangel-förmige Zone vollständiger Hämolyse, was beispielsweise bei *C. glucuronolyticum* oder

C. auris zu beobachten ist. Beim reversen CAMP-Test wird das Hämolsin des *S. aureus* Stammes durch die Phospholipase D der zu untersuchenden Stämme gehemmt. Dies ist beispielsweise bei *C. ulcerans* und *C. pseudotuberculosis* der Fall. Im positiven Fall eines reversen CAMP-Testes ist daher eine Triangel-förmige Hämolyse-Hemm-Zone zu sehen (FUNKE und BERNARD 2007).

Eine weitere biochemische Eigenschaft, die zur Differenzierung herangezogen werden kann, ist der Test auf Lipophilie. Dazu wird das Größenwachstum von Kolonien auf mit Tween 80 präparierten Blutagarplatten beurteilt (FUNKE 2009).

Für die biochemische Differenzierung sind auch kommerziell erhältliche Test-Systeme einsetzbar, wie zum Beispiel das API Coryne System der Fa. bioMérieux, in dem mehrere biochemische Parameter in einem Versuchsdurchlauf überprüft werden können. Bei dem API Coryne System werden 12 enzymatische Tests und 9 Reaktionen zur Kohlenhydratfermentation im Mikroformat getestet und aus dem Reaktionsmuster eine siebenstellige Zahlenkombination errechnet, mit der die einzelnen Spezies in einer web-basierten Datenbank kodiert sind (FRENEY et al. 1991; FUNKE et al. 1997a; FUNKE et al. 1997b; FUNKE und BERNARD 2007).

Bei diesen kommerziell erhältlichen Tests gilt jedoch, dass Fehlidentifizierungen aufgrund der noch fließenden Nomenklatur coryneformer Stäbchenbakterien und der Tatsache, dass ggf. nicht alle aktuellen Typstämme in der Datenbasis eines Tests enthalten sind, vorkommen können (FUNKE et al. 1997a; FUNKE und BERNARD 2007; ADDERSON et al. 2008a).

2.4.3 Chemisch-physikalische Methode

Eine relativ neue und sehr schnelle Methode zur Speziesidentifizierung ist die MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry). Generell dient die Massenspektrometrie zur Bestimmung der Molekülmasse durch Ionisierung der Analytmoleküle sowie Trennung und Nachweis der Analytionen. Das Prinzip der MALDI-TOF Massenspektrometrie besteht darin, dass die verwendete Matrix die Freisetzung und Ionisierung der Probenmoleküle erleichtert. Dazu werden die aufgereinigte Probe und die Matrix (z.B. alpha-Cyano-4-Hydroxymizinsäure) auf einer Trägerplatte gemischt. Bei der Trocknung kommt es zur Kokristallisation von Analyt und Matrix. Ein intensiver Impuls kurzweiliger Laserstrahlen im Hochvakuum setzt Matrix- und Probenmoleküle frei (siehe linkes Bild der Abbildung 1). Gleichzeitig kommt es zur Ionisation und Beschleunigung der Moleküle im elektrischen Feld. Die Massenbestimmung erfolgt über die Messung der Zeit zwischen dem Start der Ionen in der Quelle bis zum Eintreffen am Detektor. Zudem werden die Ionen in der feldfreien Drift-Strecke nach ihrem

Masse/Ladungs- (m/z -) Verhältnis aufgetrennt. Das Masse/Ladungs-Verhältnis lässt sich dann aus der gemessenen Flugzeit mit der Gleichung $m/z = 2eU_a * t^2 / L^2$ berechnen, wobei e für die Elementarladung, U_a für die Beschleunigungsspannung, t für die Gesamtflugzeit und L für die Länge der Drift-Strecke steht. Der Detektor wandelt die ankommenden Ionen dann in ein elektrisches Signal um (siehe rechtes Bild der Abbildung 1) (LOTTSPREICH und ENGELS 2006).

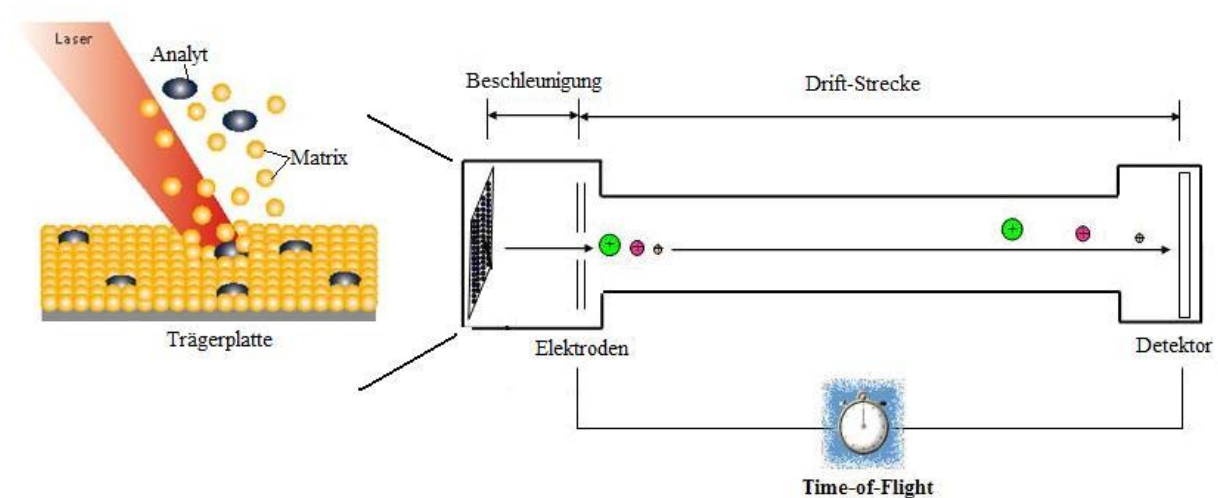


Abbildung 1: Funktionsweise der MALDI-TOF MS
(übernommen und modifiziert von www.eurogenetec.com und LOTTSPREICH und ENGELS (2006))

Zur Identifikation wird das entstandene Spektrum mit Referenzspektren einer Datenbank abgeglichen. Die Auswertung der Spektren mittels einer Software, beispielsweise Biotyper Automation Control (Fa. Daltonics, Bremen), erfolgt automatisch. Der Score Value der Ergebnisliste (siehe Abbildung 2) stellt dabei die Qualität der Identifizierungsergebnisse dar und wird aus folgenden Faktoren berechnet: Anzahl übereinstimmender Peaks zwischen Probenspektrum und Referenzspektrum, Anzahl übereinstimmender Peaks zur Gesamtzahl der Peaks und Intensität der Peaks (LOTTSPREICH und ENGELS 2006). Ein verlässliches Ergebnis auf Speziesebene setzt dabei mindestens einen Score Value von ≥ 2 voraus.

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+++)	Corynebacterium xerosis DSM 20743T DSM	2.503	1725
2 (+)	Corynebacterium freneyi DSM 44506T DSM	1.77	134034
3 (-)	Acinetobacter towneri DSM 14962T HAM	1.458	202956
4 (-)	Arthrobacter stackebrandtii DSM 16005T DSM	1.432	272161
5 (-)	Corynebacterium amycolatum PX_25086111 MLD	1.423	43765
6 (-)	Lactobacillus fermentum DSM 20055 DSM	1.423	-
7 (-)	Bacillus cereus DSM 31T DSM	1.418	1396
8 (-)	Staphylococcus hominis ssp novobiosepticus DSM 15614T DSM	1.395	145393
9 (-)	Staphylococcus simiae DSM 17636T DSM	1.389	308354
10 (-)	Sphingobacterium mizutaii DSM 11724T HAM	1.379	1010

Abbildung 2: Beispiel einer Ergebnisliste basierend auf der Score Value Berechnung mittels MALDI Biotyper

Seit den 1990er Jahren werden mit der MALDI-TOF MS Proteine aus Bakterien-Extrakten analysiert, darunter auch Biomarker, welche eine Speziesidentifizierung der Bakterien ermöglichen. Dazu werden die Spektren dieser Biomarker als Referenzspektren verwendet. Der Abgleich mit den Spektren unbekannter Bakterien erlaubt so deren Identifizierung (HOLLAND et al. 1996; KRISHNAMURTHY und ROSS 1996).

Mit Hilfe der MALDI-TOF MS können Mengenbestimmungen von Stoffwechselmetaboliten bei Corynebakterien wie beispielsweise Lysin, Alanin oder Glukose durchgeführt werden (WITTMANN und HEINZLE 2001a; WITTMANN und HEINZLE 2001b; FANOUS et al. 2008).

KONRAD et al. (2010) evaluierten als erste die Fähigkeit der MALDI-TOF MS für die Identifizierung potentiell toxischer *Corynebacterium spp.*. Verglichen wurden dabei die Ergebnisse der biochemischen Differenzierung mittels API Coryne System mit der MALDI-TOF MS und der *rpoB*-Sequenzierung. Bei 99,1% Übereinstimmung der Ergebnisse mit der *rpoB*-Sequenzierung und einem geringen Zeitaufwand von ca. 15 Minuten erwies sich die MALDI-TOF MS als die geeignetere Untersuchungsmethode. Zudem würde die MALDI-TOF MS aufgrund des geringen Zeitaufwandes zur schnelleren Diagnose und Behandlung von Krankheiten beitragen.

Auch in anderen Studien wurde die MALDI-TOF MS mit biochemischen Methoden und der *rpoB*- und 16S rDNA-Sequenzierung verglichen. Aufgrund der ebenfalls guten Ergebnisse

der MALDI-TOF MS als Identifizierungsmethode wird vorgeschlagen die MALDI-TOF MS als Ersatz für zeitaufwendigere Methoden heranzuziehen (MELLMANN et al. 2008; SENG et al. 2009; CHERKAoui et al. 2010; BIZZINI et al. 2011).

2.4.4 Molekularbiologische Methoden

Zunehmend etablieren sich molekularbiologische Identifikationssysteme. So werden beispielsweise die Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-Analyse (RFLP-Analyse) und die daraus weiter entwickelte Amplifizierte Ribosomale DNA Restriktions Analyse (ARDRA) von PCR-amplifizierter 16S rDNA zur Identifizierung eingesetzt. Dazu wird die 16S rDNA durch Restriktionsenzyme in Fragmente zerlegt, die mit Hilfe der PCR vermehrt und anschließend durch Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Die Auswertung erfolgt anhand des entstehenden Bandenmusters (CARLOTTI und FUNKE 1994; VANEECHOUTTE et al. 1995).

AUBEL et al. (1997) ermitteln die Spezies einiger Corynebakterien durch die Längenbestimmung der 16-23S-rRNA „Intergenic Spacer Region“. Sie verwenden dazu Primer, die 30 bis 40 Nukleotide vor dieser Region binden.

Als etablierter Goldstandard für die taxonomische Untersuchung der coryneformen Bakterien gilt weiterhin die 16S rDNA-Analyse. Dazu wird ein 800 bp langer Bereich der 16S rDNA vermehrt. Dieser Bereich enthält hoch konservierte und hoch variable Genabschnitte, die für eine phylogenetische Charakterisierung verwendet werden können. Jedoch ist zu beachten, dass einige *Corynebacterium spp.* sehr wenige Sequenzunterschiede zueinander aufweisen. Deren Divergenz liegt zum Teil unterhalb der üblichen 3%, die zwischen zwei unterschiedlichen Spezies existiert. Als Beispiel seien hier *C. ulcerans* und *C. pseudotuberculosis* mit einer Divergenz von < 2% bei ca. 1400 Basenpaaren (bp) genannt. Eine fehlerfreie Identifizierung ist daher nur möglich, wenn die ganze 16S rDNA sequenziert wird (KIRSCHNER et al. 1993; PASCUAL et al. 1995; DAUGA et al. 1997; BERNARD 2005; KHAMIS et al. 2005; FUNKE 2009; CHERKAoui et al. 2010). KHAMIS et al. (2004; 2005) evaluieren als Alternative zur etablierten 16S rDNA-Sequenzierung die Sequenzierung eines zwischen 434 bis 453 bp großen Fragments des *rpoB*-Gens. Dieses Gen, das den beta-Abschnitt der RNA-Polymerase codiert, weist häufig einen größeren Polymorphismus innerhalb des Genus *Corynebacterium* auf. Die prozentuale Homologie dieses Fragmentes verschiedener Spezies ist geringer als bei der 16S rDNA-Sequenzierung und erlaubt so eine genauere Differenzierung (KHAMIS et al. 2005; ADDERSON et al. 2008a; PALACIOS et al. 2010).

2.4.5 Sonstige Methoden

In Referenzlaboratorien werden zur Identifizierung auch chromatographische Methoden eingesetzt. Zum Nachweis von Mykolsäuren oder der Diaminosäure des Peptidoglykans kann beispielsweise die Dünnschichtchromatographie eingesetzt werden. Die Gaschromatographie erlaubt in vielen Fällen die Identifizierung auf Genusebene anhand der Analyse der zellulären Fettsäuren (BERNARD et al. 1991; DE BRIEL et al. 1992; FUNKE und BERNARD 2007).

2.5 Toxinnachweis

Der direkte Toxin-Nachweis erfolgt aus Erregerkulturen mit dem Elek-Test. Dies ist ein Immunpräzipitationstest, der mit Hilfe von Diphtherie-Antitoxin durch die Bildung einer weißen Präzipitationslinie mögliche Toxin-bildende Stämme identifizieren kann (ENGLER et al. 1997; EFSTRATIOU et al. 1998; SCHÜTT-GEROWITT und BEUTH 2001).

Molekularbiologisch kann das *tox*-Gen aus Erregerkulturen oder direkt aus klinischem Material mittels konventioneller oder Realtime-PCR detektiert werden (HAUSER et al. 1993; NAKAO und POPOVIC 1997; EFSTRATIOU et al. 2000; MOTHERSHED et al. 2002; CASSIDAY et al. 2008).

Molekularbiologische Verfahren sollten allerdings nur zur orientierenden Diagnostik herangezogen werden, da nicht alle *tox*-Gen positiven Stämme auch ein aktives Protein produzieren (EFSTRATIOU et al. 2000; PODBIELSKI et al. 2010).

SING et al. (2003) weisen Unterschiede im Diphtherie-Toxin-Gen von *C. diphtheriae* und *C. ulcerans* nach. Trotz ihrer 95%-igen Homologie sind dies Gene speziell an Translokations- und Rezeptorbindungsstelle in ihrer Basenzusammensetzung verschieden. SING et al. (2003) entwickeln zur schnelleren Identifizierung einen neuen Revers-Primer für die konventionelle PCR des Diphtherie-Toxin-Gens speziell für *C. ulcerans* und mit einer neuen Realtime-PCR ermöglichen SCHUHEGGER et al. (2008a) die Detektion beider Toxin-Gene in einer Methode. Erst kürzlich wurde nun ein LightCycler PCR-Verfahren für die zuverlässige Erkennung der Toxin-Gene von *C. diphtheriae* und *C. ulcerans* und die Differenzierung der entsprechenden Zielgene durch Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) entwickelt und evaluiert, was die genaue Identifizierung dieser beiden *Corynebacterium spp.* und ihrer Toxine wesentlich vereinfacht und beschleunigt (SING et al. 2011).

3 Material und Methoden

Die in der vorliegenden Studie verwendeten Materialien und Reagenzien sind in Anlage 4 aufgeführt.

3.1 Probenplan und Probenmaterial

Es wurden 41 landwirtschaftliche Betriebe aus den Regierungsbezirken Oberbayern, Niederbayern, Schwaben, Oberpfalz und Mittelfranken beprobt. Im ersten Betrieb wurden Nasentupfer von je fünf, in den Betrieben 2 bis 4 wurden Nasentupfer von je zwölf und in den übrigen Betrieben Nasentupfer von je zehn Schweinen gezogen, die über verschiedene Altersklassen, unterschiedliche Buchten und Stallabteile verteilt waren. Pro Tier wurde jeweils immer eine Nasentupferprobe entnommen.

Alle weiblichen Tiere nach dem Decken bis vor dem ersten Wurf wurden dabei als Jungsauen und nach dem ersten Wurf als Altsauen angesehen. Tiere von der ersten bis zur vierten Lebenswoche galten als Ferkel und bis zur 12. Lebenswoche als Aufzuchtferkel. Als Mastschweine wurden Tiere definiert, die älter als 12 Wochen waren und bis zur Schlachtung im Betrieb verblieben.

Bei 17 Ferkeln wurden zusätzlich zu den Nasentupfern auch Tonsillentupfer genommen, um einen Vergleich dieser beiden Lokalisationen zu ermöglichen.

Die Tierbesitzer konnten auf freiwilliger Basis ebenfalls an der Studie teilnehmen. Die Studienteilnehmer gaben dafür eine Einverständniserklärung nach Anlage 1 ab, erhielten ein Merkblatt (siehe Anlage 2) mit Informationen über Corynebakterien und entnahmen sich dann selbst eine Abstrichprobe aus beiden Nasenvorhöfen. Insgesamt beteiligten sich 30 Personen von 27 Betrieben.

3.2 Betriebscharakteristika

Zur näheren Charakterisierung der Betriebe wurde für jeden Betrieb zusammen mit dem Betriebsinhaber ein Fragebogen nach Anlage 3 ausgefüllt. Besonders beachtet wurden die Hygienemaßnahmen, anhand derer ein Hygienescore für die einzelnen Betriebe erstellt wurde.

Für die Erfüllung folgender Kriterien wurde jedem Betrieb jeweils ein Punkt vergeben:

- kein Kontakt zu anderen Tieren
- weniger als drei Personen mit Tierkontakt
- Hygieneschleuse vorhanden
- Schutzkleidung vorhanden
- Rein-Raus Belegung
- Krankenabteil vorhanden
- Schädnerbekämpfung wird durchgeführt
- Reinigung wird durchgeführt
- Desinfektion wird durchgeführt
- Stall steht vor Neueinstellung mindestens vier Tage leer
- kein Zukauf von Schweinen
- Quarantäne vor Einstellung.

Alle erreichten Punkte wurden am Schluss addiert und so für jeden Betrieb ein individueller Hygienescore erstellt. Mittels des Hygienescores konnten die Betriebe dann in drei Hygienestatus eingeteilt werden (siehe Tabelle 5). Je mehr Punkte erreicht wurden, umso besser wurde der Hygienestatus des Betriebes eingestuft.

Tabelle 5: Einteilung der Hygienestatus anhand des Hygienescores

Hygienestatus	Punkteinteilung
I	0-4
II	5-8
III	9-12

3.3 Probenentnahme und Transport

Die Probennahme erfolgte mit einem sterilen Tupfer aus jeweils beiden Nasenvorhöfen eines Schweines. Direkt nach der Entnahme wurde der Tupfer in steriles Amies-Transportmedium (Portagerm™Amies Agar + Wattetupfer, Fa. Copan, Brescia, Italien) überführt, bei einer Transporttemperatur von 8°C ins Labor verbracht und dort umgehend weiterverarbeitet.

3.4 Definition

Als *Corynebacterium spp.* werden in dieser Studie alle Isolate bezeichnet, die mindestens auf Genusebene als *Corynebacterium* identifiziert wurden. Alle anderen grampositiven, keulenförmigen Stäbchenbakterien werden entweder eindeutig mit ihrem taxonomischen Namen erwähnt oder zur Vereinfachung ungeachtet ihrer genauen taxonomischen Einordnung als „coryneforme Bakterien“ zusammengefasst.

3.5 Bakteriologische Untersuchungen

3.5.1 Anzucht und Isolierung von coryneformen Bakterien

Jeder Tupfer wurden mittels Dreiösenausstrich auf BD Tellurit Agar (Fa. BD Diagnostic Systems, Heidelberg) ausgeimpft. Die Agarplatten wurden dann in Anaerobiertöpfen (Fa. BD Diagnostic Systems, Heidelberg) in mikroaerophiler Atmosphäre für 48 h bei 37°C bebrütet. Von jeweils fünf verdächtigen Kolonien pro Tier bzw. Mensch wurden Subkulturen auf Schafblutagar (Fa. Oxoid Deutschland GmbH, Wesel) angelegt und unter mikroaerophilen Bedingungen bei 37°C für 24 h bebrütet.

Aus den entstandenen Reinkulturen wurden Gram-Präparate erstellt. Nur Kolonien von grampositiven, schlanken, z. T. leicht gebogenen, sporenlosen Stäbchen mit einer V- oder palisadenförmigen Lagerung (FUNKE und BERNARD 2007) wurden weiter bearbeitet.

3.5.2 Stammasservierung

Identifizierte *Corynebacterium* Stämme und andere identifizierte coryneforme Bakterien Stämme von frischen Reinkulturen wurden in Cryobank-Röhrchen (Fa. Mast Diagnostic Laboratoriumspräparate GmbH, Reinfeld) gemäß Anleitung des Herstellers überführt und bei -80°C kryokonserviert.

3.6 Biochemische Untersuchungen

3.6.1 Identifizierung mittels Katalase-Test

Zu Beginn wurde bei allen isolierten Stämmen ein Katalase-Test (Fa. bioMérieux™ SA Marcy-l'Etoile, Frankreich) durchgeführt. Stämme mit Katalase-positivem Ergebnis wurden weiteren Untersuchungen unterzogen.

3.6.2 Identifizierung mittels API Coryne

Die biochemische Differenzierung erfolgte bei 329 Stämmen mit dem API™ Coryne (Fa. bioMérieux™ SA Marcy-l'Etoile, Frankreich). In diesem Identifizierungssystem wird anhand von 21 biochemischen Reaktionen für jeden Stamm ein siebenstelliges numerisches Profil errechnet, mit dem mittels apiweb™ Identifizierungssoftware aus der API Coryne Datenbasis (V3.0; Fa. bioMérieux™ SA Marcy-l'Etoile, Frankreich) die jeweilige Spezies ermittelt werden kann.

3.6.2.1 Durchführung

Durchführung und Auswertung des Tests erfolgten nach Anleitung des Herstellers, wobei frische Reinkulturen nach 18 bis 24ständiger Bebrütung auf Schafblutagar für den Test verwendet wurden.

3.6.2.2 Auswertung

Die Ergebnisse wurden in die drei Kategorien Spezies, Genus und keine Identifizierung eingeteilt. Die genaue Einteilung ist Tabelle 6 zu entnehmen.

Tabelle 6: Einteilung der API Coryne Ergebnisse

Kategorie	Ergebnis laut API Coryne
Spezies	gute Identifizierung sehr gute Identifizierung ausgezeichnete Identifizierung
Genus	akzeptierbare Identifizierung gute Identifizierung auf Genusebene sehr gute Identifizierung auf Genusebene ausgezeichnete Identifizierung auf Genusebene
keine Identifizierung	geringe Selektivität zweifelhaftes Profil Identifizierung unakzeptierbar

3.7 Chemisch-physikalisch Untersuchung - MALDI-TOF Massenspektrometrie

Alle Kolonien von Katalase-positiven, grampositiven, schlanken, z. T. leicht gebogenen, sporenlosen Stäbchen mit einer V- oder palisadenförmigen Lagerung wurden einer Untersuchung mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie unterzogen.

3.7.1 Durchführung

Die Testdurchführung erfolgte mit frischen, 18 bis 24 h bebrüteten Reinkulturen auf Schafblutagar. Eine Impföse (Fa. Greiner bio-one, Frickenhausen) Koloniematerial einer Einzelkolonie wurden in 300 µl DEPC – Wasser (Fa. MoBio Laboratories, Carlsbad, USA) in einem Eppendorf Reaktionsgefäß (Fa. Eppendorf AG, Hamburg) suspendiert, anschließend wurde der Suspension 900 µl Ethanol (Fa. Carl Roth GmbH + Co. KG., Karlsruhe) zugegeben und gründlich auf einem Vortexer (Fa. Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz) gemischt. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 14.000 rpm für zwei Minuten mit einer Tischzentrifuge (Fa. Eppendorf AG, Hamburg) wurde der Überstand verworfen und das Tube für max. 30 Minuten mit der Öffnung nach unten zum Trocknen aufgestellt. Das so erhaltene Pellet wurden dann zunächst in 50 µl 70% (v/v) Ameisensäure (Fa. Carl Roth GmbH + Co. KG., Karlsruhe) resuspendiert, 50 µl Acetonitril (Fa. Carl Roth GmbH + Co. KG., Karlsruhe) zugegeben, sorgfältig gemischt und erneut für zwei Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert. Für die Messung wurde 1 µl des klaren Überstandes auf einen Stahlträger überführt und bei Raumtemperatur für fünf bis zehn Minuten getrocknet. Die Probe wurde schließlich mit 0,6 µl Matrix-Lösung (Anlage 4.1.2) überschichtet und erneut für fünf bis zehn Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Die Messung im Spektrometer microflex LT (Fa. Bruker Daltonics, Bremen) erfolgte automatisch über die Biotyper Software.

3.7.2 Auswertung

Die Auswertung der Spektren und der Abgleich mit der Referenzdatenbank erfolgte automatisch durch das Programm Biotyper Automation Control (Fa. Bruker Daltonics, Bremen). Die Einteilung der Ergebnisse wurde in den folgenden vier Ergebniskategorien vorgenommen:

- Spezies (Score Value zwischen $\geq 2,0$ und $3,0$)
- Genus (Score Value zwischen $1,7$ und < 2)
- keine Identifizierung möglich (Score Value $< 1,7$)

- keine Identifizierung als *Corynebacterium* auf Genus- oder Speziesebene

Proben, die nicht als *Corynebacterium* auf Genus- oder Speziesebene identifiziert wurden, wurden keinen weiteren Untersuchungen unterzogen und direkt verworfen.

Eine Wiederholung der Messung mit einer frischen Subkultur erfolgte bei allen Stämmen, die bei der ersten Messung einen Score Value kleiner zwei hatten.

3.8 Molekularbiologische Untersuchungen

3.8.1 Allgemeine Vorbereitungen

3.8.1.1 Extraktion bakterieller DNA aus frischen Reinkulturen

Fünf bis zehn Bakterienkolonien des zu überprüfenden Stammes wurden mit sterilen Tupfern (Fa. bioMérieux™ Deutschland GmbH, Nürtingen) abgenommen und in 200 µl 1xPBS-Puffer suspendiert. Mit dem High Pure PCR Template Preparation Kit (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) wurde dann gemäß der Kit-Arbeitsanleitung die DNA extrahiert.

Bis zur weiteren Verwendung wurden die gewonnenen DNA-Extrakte bei 4°C gelagert.

3.8.1.2 Extraktionskontrolle

An letzter Position in jeder Extraktion wurde eine Extraktionskontrolle zur Detektion von Kreuzkontaminationen mitgeführt. Anstatt des Probenmaterials wurde eine Leerprobe, also reiner 1x PBS-Puffer extrahiert. Das so gewonnene Eluat wurde in die PCR wie eine Proben-DNA eingesetzt.

3.8.1.3 MasterMix-Kontrolle

Die MasterMix-Kontrolle ist ein Reagenzien-Blindwert zur Überprüfung der Komponenten des MasterMixes. Statt DNA wurde das gleiche Volumen Wasser (PCR-grade) in entsprechenden Mengen in die PCR-Reaktion eingesetzt.

3.8.2 Amplifizierung des *rpoB*-Gens mittels konventioneller PCR

Bei 22 Isolaten wurde das *rpoB*-Gen zur anschließenden Sequenzierung amplifiziert, um das Ergebnis der MALDI-TOF MS Analyse zu bestätigen. 19 Stämme hatten einen Score-Wert $\geq 2,0$, zwei Stämme einen Score-Wert zwischen 1,7 und < 2 und ein Stamm einen Score-Wert unter 1,7.

Die Herstellung des MasterMixes erfolgte mit *rpoB*-Primern mit zum Teil degenerierten Basen.

Für vier laut MALDI-TOF MS als *C. xerosis* (Value Score $\geq 2,0$) identifizierte Stämme dieser Untersuchung wurde der MasterMix zusätzlich modifiziert, indem Primer und Polymerase auf unterschiedliche Weise ausgetauscht wurden.

3.8.3 Herstellung des MasterMixes für die *rpoB*-PCR

Der MasterMix wurde in Biopure Reaktionsgefäßen (Fa. Eppendorf AG, Hamburg) hergestellt. Verwendet wurde dazu die AmpliTaq DNA Polymerase (Fa. Applied Biosystems, CA 94404, USA) und Primer mit zum Teil degenerierten Basen (siehe Anlage 4.2.3.1, Tabelle 20).

Für vier laut MALDI-TOF MS als *C. xerosis* (Value Score $\geq 2,0$) identifizierte Stämme wurden zusätzlich zu den universellen *rpoB*-Primern für Corynebakterien aus Tabelle 20 (siehe Anlage 4.2.3.1) spezifische Primer für *C. xerosis* verwendet. Bei diesen Primern (vgl. Tabelle 21, Anlage 4.2.3.1) wurden die degenerierte Basen durch die entsprechenden Base von *C. xerosis* ersetzt.

Zusätzlich dazu wurde der in Tabelle 8 dargestellte HotStarTaq MasterMix (Fa. Qiagen, Hilden) eingesetzt, der eine HotStart-Polymerase enthält, die vor der PCR-Reaktion durch eine 15-minütige Erhitzung bei 95°C aktiviert wird.

Insgesamt wurden vier verschiedenen Reaktionsansätze für diese vier *C. xerosis* Stämme erstellt:

- C2700 Forward und C3130 Reverse Primer mit AmpliTaq DNA Polymerase
- C2700 Forward und C3130 Reverse Primer mit HotStart-Polymerase
- Cxe2718-fw und Cxe3139-re Primer mit AmpliTaq DNA Polymerase
- Cxe2718-fw und Cxe3139-re Primer mit HotStart-Polymerase

Die Angaben in Tabelle 7 und Tabelle 8 gelten jeweils für einen 50 µl-Ansatz.

Tabelle 7: MasterMix mit AmpliTaq DNA Polymerase

Komponente	Konzentration Gebrauchslösung	Konzentration im PCR- Ansatz	Menge pro Ansatz in µl
10xPuffer ohne MgCl ₂	10x	1x	5
MgCl ₂	25 mM	1,8 mM	3,6
forward Primer	10 µM	0,2 µM	1
reverse Primer	10 µM	0,2 µM	1
dNTP – Mix	2,5 mM pro dNTP	0,2 mM pro dNTP	4
AmpliTaq DNA Polymerase	5U/µl	1,25 U/Ansatz	0,25
PCR-grade- H ₂ O			29,8
Volumen MasterMix			45
+ DNA			5
Totales Volumen			50

Tabelle 8: MasterMix mit HotStarTaq MasterMix

Komponente	Konzentration Gebrauchslösung	Konzentration im PCR-Ansatz	Menge pro Ansatz in µl
PCR-grade- H ₂ O			15
HotStarTaq MasterMix	2x	1x	25
Primer Forward	10 µM	0,2 µM	2,5
Primer Reverse	10 µM	0,2 µM	2,5
Volumen MasterMix			45
+ DNA			5
Totales Volumen			50

3.8.4 Amplifizierung der 16S rDNA mittels konventioneller PCR

Die Amplifizierung des 16S rDNA zur anschließenden Sequenzierung erfolgte mit 329 Stämmen, die bereits mit dem API Coryne System und der MALDI-TOF MS untersucht wurden (siehe 3.6.2 und 3.7). Ziel war es, die Ergebnisse der Sequenzierung mit den Ergebnissen des API Coryne System und der MALDI-TOF MS abzugleichen und die massenspektrometrischen Ergebnisse zu bestätigen.

3.8.5 Herstellung des MasterMixes für die 16S rDNA-PCR

Für den MasterMix wurde ausschließlich die AmpliTaq DNA Polymerase und die Primer, wie sie in Tabelle 22, Anlage 4.2.3.2 zu finden sind, verwendet.

Die Erstellung des MasterMixes kann Tabelle 7 (Abschnitt 3.8.3) entnommen werden. Auch hier gelten die Angaben für einen 50 µl-Ansatz.

3.8.6 Durchführung der PCR

Nukleasefreie PCR-Strips (Fa. Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldenburg) wurden mit jeweils 45 µl MasterMix sowie 5 µl der zu untersuchenden Proben-DNA befüllt. Bei jedem Lauf wurde eine Extraktionskontrolle und Wasser (PCR-grade) für die MasterMix-Kontrolle mitgeführt. Anschließend wurden alle Proben kurz zentrifugiert und die PCR im Thermozykler (Fa. Eppendorf AG, Hamburg) gemäß dem entsprechenden Temperatur-Zeit-Programm inkubiert.

Je nach Zusammensetzung des MasterMixes und der verwendeten Primer benötigt man unterschiedliche Temperatur-Zeit-Programme. Die genauen Angaben dazu sind in Anlage 4.2.4 zu finden.

3.8.7 Detektion der PCR-Produkte mit dem Bioanalyzer

Diese Methode basiert auf der Lab-on-a-Chip Technologie, dem Prinzip der Mikrofluidik, also der Steuerung winziger Flüssigkeitsmengen in miniaturisierten Systemen. Das System ersetzt die herkömmliche Agarose-Gelelektrophorese mit anschließender Färbung und Photo-dokumentation. Stattdessen erhält man ein Gel-Like-Picture.

3.8.7.1 Handhabung

Das Beladen des Chips (DNA 1000 LabChip Kit, Fa. Agilent Technologies, Waldbronn) erfolgte nach den Arbeitsanweisungen des Agilent DNA 1000 Kit Quick Start Guide. Danach wurde der Chip umgehend in den Agilent 2100 Bioanalyzer (Fa. Agilent Technologies, Waldbronn) eingesetzt und das Gerät gestartet. Dies erfolgt nach Anweisungen des User's Guide for the Agilent 2100 Expert Software.

3.8.7.2 Auswertung

Die Auswertung erfolgte anhand des Gel-Like-Pictures nachdem die Peaks bzw. Banden des Standards kontrolliert worden waren.

Für das *rpoB*-Gen müssen deutliche Banden im Bereich von 434 bis 453 bp und für die 16S rDNA im Bereich von 800 bp zu sehen sein.

War dies der Fall, konnten die PCR-Produkte weiterverarbeitet werden.

3.8.8 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Fa. Qiagen, 40724 Hilden) nach dem QIAquick™ Spin Handbuch.

Die PCR-Produkte wurden im letzten Aufreinigungsschritt in sterile, nukleasefreie Reaktionsgefäße überführt und bei 4°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

3.8.9 Sequenzierung der PCR-Produkte

Die Sequenzierung der aufgereinigten PCR-Produkte erfolgte durch die Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg.

Die Sequenzier-PCR für die 16S rDNA wurde dort mit dem fD1-forward Primer und für das *rpoB*-Gen mit C2700 Forward und C3130 Reverse durchgeführt.

3.8.10 Analyse und Auswertung der Sequenzen

Die von der Firma Eurofins MWG Operon übermittelten Sequenzen wurden zur Auswertung mittels BLAST mit der NCBI-Datenbank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) abgeglichen (ALTSCHUL et al. 1997).

Anhand der Prozent der maximalen Identifizierung wurden die Ergebnisse, wie Tabelle 9 zu entnehmen ist, in drei Kategorien eingeteilt.

Tabelle 9: Einteilung der Sequenzierungsergebnisse

Kategorie	maximalen Identifizierung
Spezies	$\geq 98 \%$
Genus	94 – 97%
keine Identifizierung	$\leq 93\%$

3.9 Statistische Auswertung

Die Auswertung der von Tieren und Betriebsangehörigen schweinehaltender Betriebe erhobenen Daten erfolgte mittels Microsoft Office Excel 2003. Für die Berechnungen des Methodenvergleichs von API Coryne, MALDI-TOF MS und 16S rDNA-Sequenzierung wurde ebenfalls Microsoft Office Excel 2003 verwendet. Für die Deskriptive Statistik der Ergebnisse wurden die Daten in SPSS 17.0 übertragen.

Um signifikante Unterschiede in den erhobenen Daten statistisch belegen zu können, wurde der Chi²-Test und bei multiplen Vergleichen die Bonferroni-Korrektur, entsprechend der Anzahl der zu vergleichenden Daten, angewendet. Das Maß der Übereinstimmung von Daten oder Methoden wurde mit Kappa ermittelt. Ebenfalls wurden die Konfidenzintervalle vieler Ergebnisse erstellt, sich nicht überlappende Intervalle wurden als signifikant erachtet.

Eine genaue Auflistung der bei den untersuchten Faktoren angewendeten Testverfahren ist Tabelle 10 zu entnehmen.

Tabelle 10: Statistische Berechnungsverfahren untersuchter Einflussfaktoren

Testverfahren	untersuchte Faktoren
Chi ² -Test und Bonferroni-Korrektur	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Zusammensetzung der nasalen <i>Corynebacterium</i>-Flora und verwandter Arten bei Schweinen <ul style="list-style-type: none"> • unterschiedliche Altersklassen • unterschiedliche Betriebsarten • unterschiedliche Regionen ▪ Zusammensetzung der nasalen <i>Corynebacterium</i>-Flora und verwandter Arten von Betriebsangehörigen schweinehaltender Betriebe ▪ Abhängigkeit der Zusammensetzung der nasalen <i>Corynebacterium</i>-Flora bei Schweinen von bestimmten Betriebsparametern ▪ Methodenvergleich
Kappa	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Methodenvergleich
Konfidenzintervall	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Methodenvergleich ▪ Zusammensetzung der nasalen <i>Corynebacterium</i>-Flora und verwandter Arten bei Schweinen <ul style="list-style-type: none"> • unterschiedliche Altersklassen • unterschiedliche Regionen ▪ Zusammensetzung der nasalen und tonsillären <i>Corynebacterium</i>-Flora bei Schweinen

4 Ergebnisse

4.1 Verteilung der beprobten Bestände nach Region und Betriebsart

Die Probennahme erfolgte von August bis Dezember 2009 in insgesamt 41 landwirtschaftlichen Betrieben Bayerns. 39% (n=16) dieser Betriebe waren Ferkelerzeuger und 32% (n=13) reine Mastbetriebe, während 29% (n=12) dieser Betriebe geschlossene Systeme waren (siehe Abbildung 3).

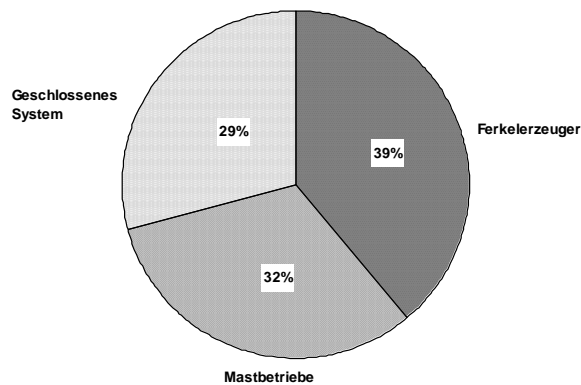


Abbildung 3: Anteil der Produktionsformen an den insgesamt 41 beprobten Betrieben

32% der untersuchten Betriebe befanden sich im Regierungsbezirk Oberbayern, 22% in Niederbayern und 20% in Schwaben. Weitere Betriebe wurden in der Oberpfalz (15%) und Mittelfranken (12%) beprobt (siehe Tabelle 11).

Während sechs von 13 untersuchten Mastbetrieben vor allem in Schwaben angesiedelt waren, lagen fünf von 12 der geschlossenen Systeme in Oberbayern. Jeweils sechs von 16 Ferkelerzeugerbetrieben wurden sowohl in Oberbayern als auch in Niederbayern beprobt.

Die geographische Verteilung wird in Abbildung 4 dargestellt.

Tabelle 11: Zuordnung der untersuchten Betriebe zu Regierungsbezirk und Betriebsart

Regierungsbezirke	Ferkelerzeuger	Mastbetrieb	geschlossenes System	Betriebe gesamt
Oberbayern	6	2	5	13
Niederbayern	6	1	2	9
Oberpfalz	2	1	3	6
Schwaben	1	6	1	8
Mittelfranken	1	3	1	5
Gesamt	16	13	12	41

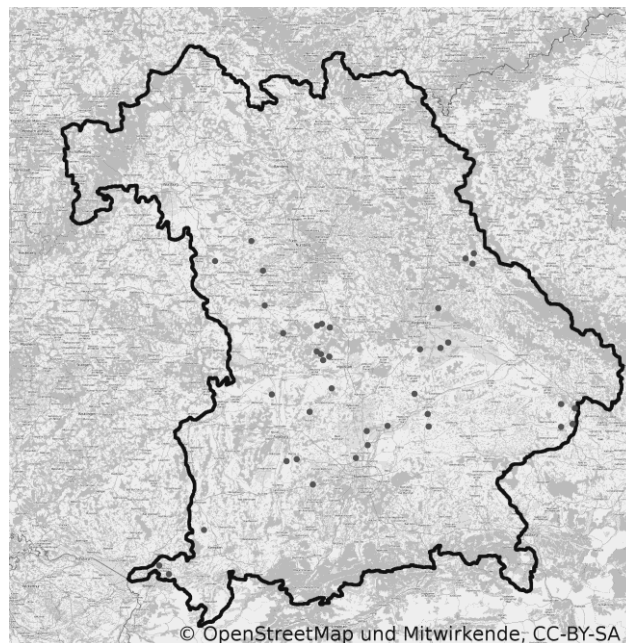


Abbildung 4: Verteilung der beprobten Betriebe über Bayern
 (übernommen und modifiziert von <http://www.openstreetmap.org/copyright>)

4.2 Methodenvergleich

4.2.1 Identifizierungspotential verschiedener Methoden für coryneforme Isolate

Zunächst sollte anhand von 329 Isolaten coryneformer Keime untersucht werden, welche der drei Methoden - API Coryne, MALDI-TOF MS oder 16S rDNA-Sequenzierung - zur Identifizierung coryneformer Isolate am besten geeignet ist. Davon waren 158 Isolate porcinen und 171 humanen Ursprungs (siehe Abbildung 6 und Abbildung 7).

Wie Abbildung 5 zeigt, waren mit MALDI-TOF MS 79% (n=259) aller Isolate (n=329) auf Speziesebene identifizierbar, während mit 16S rDNA-Sequenzierung für 44% (n=146) und

mit API Coryne für 31% (n=101) der Isolate die Spezies bestimmt werden konnte. Gleichzeitig war der Anteil der Isolate, für die keine Zuordnung zu einem Genus möglich war, mit 35% (n=114) für den API Coryne am höchsten. Dieser Anteil lag für MALDI-TOF MS bzw. 16S rDNA-Sequenzierung bei 10% (n=33) bzw. 14% (n=46).

Betrachtet man die Nachweisrate für Corynebakterien der drei in der vorliegenden Studie angewendeten Methoden auf Speziesebene, ergaben sich signifikanten Unterschiede zwischen MALDI-TOF MS und 16S rDNA-Sequenzierung ($p<0,001$), zwischen MALDI-TOF MS und API Coryne ($p<0,001$) und zwischen API Coryne und 16S rDNA-Sequenzierung ($p=0,0003$) (siehe Abbildung 5).

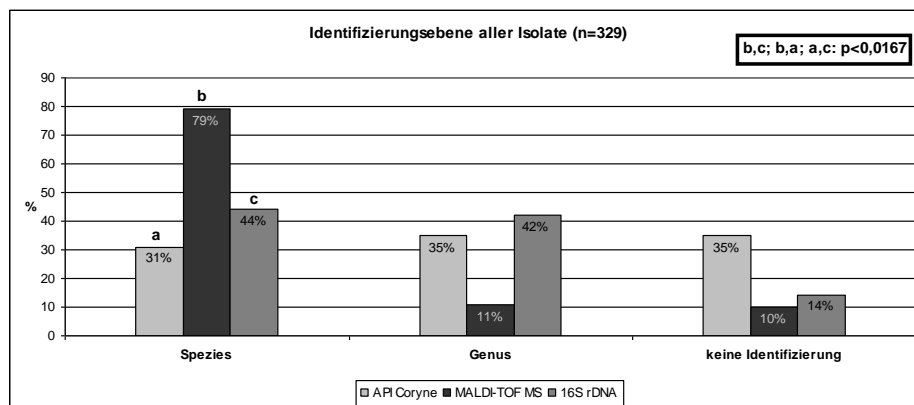


Abbildung 5: Vergleich des Identifizierungspotentials von API Coryne, MALDI-TOF MS und 16S rDNA-Sequenzierung für *Corynebacterium spp.* und nah verwandte coryneforme Bakterien aller untersuchten 329 Isolate

Alle drei Methoden zeigten sowohl für die Isolate porcinen als auch humanen Ursprungs eine ähnlich gute Identifizierung auf Speziesebene wie für die Speziesidentifizierung aller 329 zusammengefassten Isolate (siehe Abbildung 6 und Abbildung 7). Auch hier zeigten sich für den Nachweis von Corynebakterien auf Speziesebene signifikante Unterschiede zwischen den drei Methoden. So wurden bei den porcinen Isolaten zwischen MALDI-TOF MS und 16S rDNA-Sequenzierung ($p<0,001$) und zwischen MALDI-TOF MS und API Coryne ($p<0,001$) signifikante Unterschiede im Nachweis aufgezeigt (siehe Abbildung 6). Bei den humanen Isolaten zeigt sich ein signifikanter Unterschied im Nachweis auf Speziesebene zwischen MALDI-TOF MS und 16S rDNA-Sequenzierung ($p<0,001$), zwischen MALDI-TOF MS und API Coryne ($p<0,001$) und zwischen API Coryne und 16S rDNA-Sequenzierung ($p=0,0047$) (siehe Abbildung 7).

API Coryne und MALDI-TOF MS zeigten für die Isolate porcinen und humanen Ursprungs auch eine ähnlich gute Identifizierung auf Genusebene wie für die Identifizierung auf Genusebene aller 329 zusammengefassten Isolate. So identifizierte API Coryne 30% der humanen und 39% der porcinen und MALDI-TOF MS 11% der humanen und 12% der porcinen Isolate nur auf Genusebene. Für die 16S rDNA-Sequenzierung hingegen waren von den humanen Isolaten 53% nur auf Genusebene identifizierbar. 4% konnten nicht bestimmt werden. Der Anteil der mittels 16S rDNA-Sequenzierung nur auf Genusebene identifizierter, porciner Isolate lag bei 29% und der nicht identifizierbarer, porciner Isolate bei 25% (siehe Abbildung 6 und Abbildung 7).

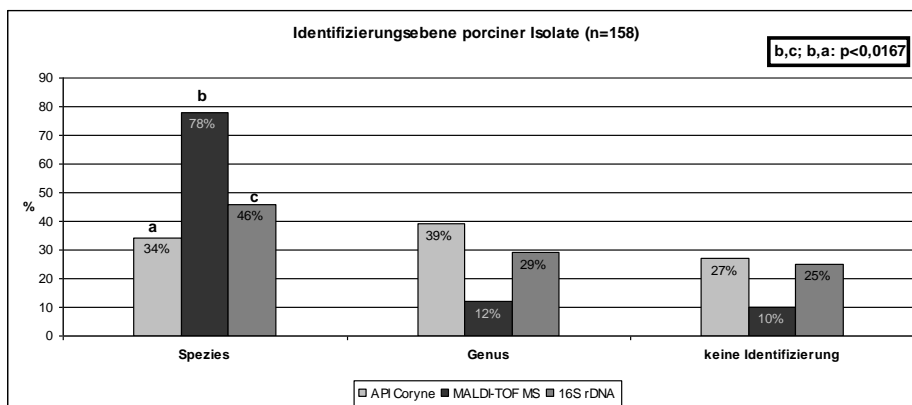


Abbildung 6: Vergleich des Identifizierungspotentials von API Coryne, MALDI-TOF MS und 16S rDNA-Sequenzierung für *Corynebacterium spp.* und nah verwandte coryneforme Bakterien der 158 porcinen Isolate

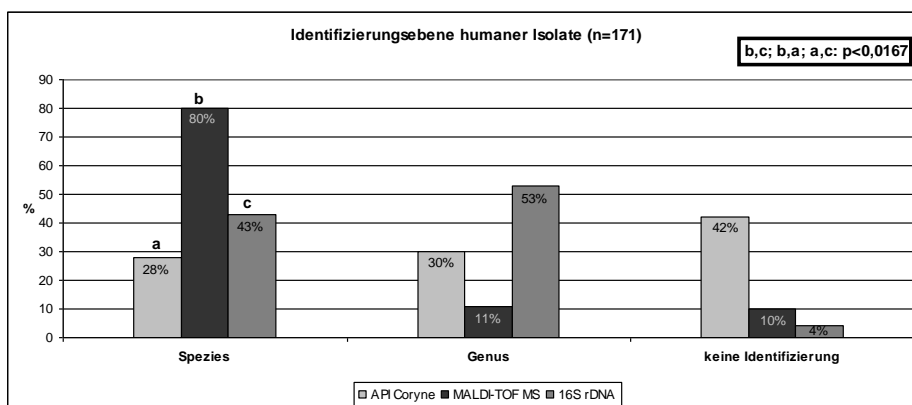


Abbildung 7: Vergleich des Identifizierungspotentials von API Coryne, MALDI-TOF MS und 16S rDNA-Sequenzierung für *Corynebacterium spp.* und nah verwandte coryneforme Bakterien der 171 humanen Isolate

Abbildung 8 zeigt das Identifizierungspotential aller drei Methoden auf Speziesebene. Die MALDI-TOF MS wies für alle Isolate eine Speziesidentifizierung von 79% und einzeln betrachtet von 78% für die porcinen und 79,5% für die humanen Isolate auf. Für die 16S rDNA-Sequenzierung lag die Speziesidentifizierung für alle Isolate bei 44% und bei Betrachtung der porcinen bzw. humanen Isolate alleine bei 46% bzw. 43%. Für den API Coryne liegt die Speziesidentifizierung bei 28% bis 34%.

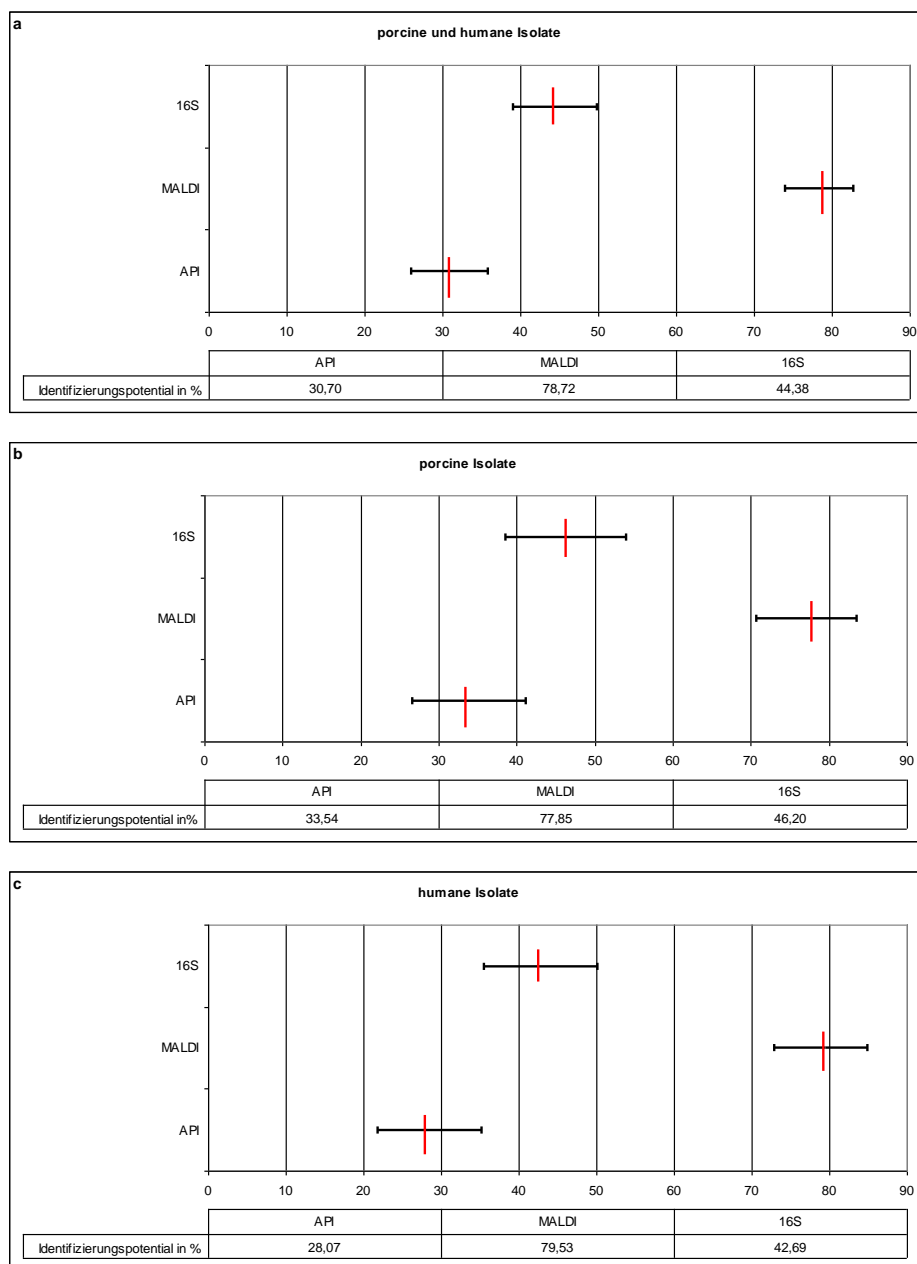


Abbildung 8: Identifizierungspotential mit Konfidenzintervallen von API Coryne, MALDI-TOF MS und 16S rDNA-Sequenzierung auf Speziesebene

- a) humane und porcine Isolate
- b) porcine Isolate
- c) humane Isolate

Prüft man die Sensitivität der MALDI-TOF MS, so hatte sie im Vergleich mit dem API Coryne eine Sensitivität von 64% und verglichen mit der 16S rDNA-Sequenzierung eine Sensitivität von 86%, siehe dazu Abbildung 9.

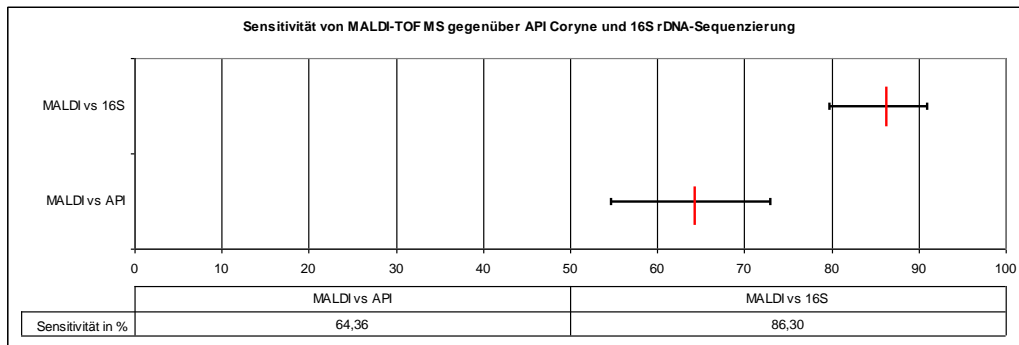


Abbildung 9: Feststellung der Sensitivität der MALDI-TOF MS anhand der Konfidenzintervalle

Wie man Tabelle 12 entnehmen kann, konnte MALDI-TOF MS aus den 329 Isolaten 15 verschiedene, 16S rDNA-Sequenzierung 13 verschiedene und API Coryne sechs verschiedene Spezies identifizieren.

Vergleicht man die Identifizierungspotentiale der drei Methoden für einige der gefundenen Stämme, ergab sich für *C. xerosis* kein signifikanter Unterschied. Für *C. ammoniagenes* unterschieden sich die Identifizierungspotentiale signifikant zwischen MALDI-TOF MS (13%) und API Coryne (0%) ($p=0,0001$) und zwischen 16S rDNA-Sequenzierung (12%) und API Coryne (0%) ($p=0,0004$). Für *Brevibacterium stationis* waren die Identifizierungspotentiale zwischen MALDI-TOF MS (12%) und 16S rDNA-Sequenzierung (3%) ($p=0,0037$) und zwischen MALDI-TOF MS (12%) und API Coryne (0%) ($p=0,0003$) signifikant. Für die Identifizierung von *C. confusum* gab es einen signifikanten Unterschied zwischen 16S rDNA-Sequenzierung (10%) und API Coryne (0%) ($p=0,0014$).

Tabelle 12: Übersicht über die isolierten Spezies während des Methodenvergleichs

Spezies (n = 329)	MALDI-TOF MS (m = 259)	16S rDNA- Sequenzierung (m = 146)	API Coryne (m = 101)
<i>C. xerosis</i>	147	78	64
<i>C. ammoniagenes</i>	34	17	0
<i>Brevibacterium stationis</i> *	31	5	0
<i>C. confusum</i>	14	14	0
<i>C. casei</i>	10	16	0
<i>C. propinquum</i>	5	2	5
<i>C. accolens</i>	4	1	18
<i>C. camporealensis</i>	3	3	0
<i>C. amycolatum</i>	2	4	0
<i>C. flavescens</i>	2	2	0
<i>C. testudinoris</i>	2	2	0
<i>Brachybacterium faecium</i>	2	0	0
<i>C. freneyi</i>	1	1	0
<i>C. glutamicum</i>	1	1	0
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	1	0	7
<i>C. diphtheriae mitis/belfanti</i>	0	0	4
<i>C. jeikeium</i>	0	0	3

* Es wird vorgeschlagen *Brevibacterium stationis* dem Genus *Corynebacterium* zuzuordnen (BERNARD et al. 2010)

4.2.2 Übereinstimmungen zwischen den Methoden auf Speziesebene

4.2.2.1 Vergleich aller drei Methoden

Von den 329 Isolaten, die mit allen drei Methoden untersucht wurden, konnten mit allen drei Methoden 47 identische Isolate auf Speziesebene identifiziert werden.

Für 35 (75%) dieser 47 Isolate erzielten alle drei Methoden auch dasselbe Ergebnis und wurden anhand MALDI-TOF MS, API Coryne und 16S rDNA-Sequenzierung als *Corynebacterium xerosis* identifiziert (siehe Tabelle 13).

Mittels MALDI-TOF MS konnten insgesamt 147 Isolate als *C. xerosis*, mittels 16S rDNA-Sequenzierung insgesamt 78 Isolate als *C. xerosis* und mittels API Coryne insgesamt 64 Isolate als *C. xerosis* identifiziert werden, davon entsprachen 35 Isolate in allen drei Methoden denselben Isolaten. Die Identifizierungspotentiale für diesen Keim unterschieden sich zwischen MALDI-TOF MS (24%) und 16S rDNA-Sequenzierung (45%) ($p=0,0075$) und zwischen MALDI-TOF MS (24%) und API Coryne (55%) ($p<0,001$) signifikant.

Von den restlichen 12 Isolaten stimmte die Speziesidentifizierung von 11 (23%) zwischen MALDI-TOF MS und der 16S rDNA-Sequenzierung überein, während das Ergebnis des API Coryne abwich. Nur bei Isolat Nr. 22201 führten alle drei Methoden zu unterschiedlichen Speziesidentifizierungen (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: Isolate, die mittels der drei verwendeten Methoden auf Speziesebene identifiziert werden konnten

Anzahl der Isolate	MALDI-TOF MS	16S rDNA-Sequenzierung	API Coryne
35	<i>C. xerosis</i>		
3	<i>C. ammoniagenes</i>		<i>C. accolens</i>
2	<i>C. propinquum</i>		<i>C. pseudodiphtheriticum</i>
1	<i>C. accolens</i>		<i>C. propinquum</i>
1	<i>C. confusum</i>		<i>C. accolens</i>
1	<i>C. confusum</i>		<i>C. propinquum</i>
1	<i>Brevibacterium stationis</i> *		<i>C. accolens</i>
1	<i>C. xerosis</i>		<i>C. diphtheriae mitis/belfanti</i>
1	<i>C. xerosis</i>		<i>C. propinquum</i>
1	<i>Brevibacterium stationis</i>	<i>C. ammoniagenes</i>	<i>C. accolens</i>
47	Summe		

* Es wird vorgeschlagen *Brevibacterium stationis* dem Genus *Corynebacterium* zuzuordnen (BERNARD et al. 2010)

4.2.2.2 Vergleich MALDI-TOF MS mit der 16S rDNA-Sequenzierung

Von den 329 Isolaten, die mit allen drei Methoden untersucht wurden, konnten 259 Isolate mit MALDI-TOF MS und 146 Isolate mit 16S rDNA-Sequenzierung auf Speziesebene identifiziert werden. Das Maß der Übereinstimmung dieser beiden Methoden für die Identifizierung auf Speziesebene war mit $\kappa=0,138$ jedoch schwach.

Aus diesen insgesamt 329 Isolaten resultierte in 127 Fällen sowohl bei MALDI-TOF MS als auch bei der 16S rDNA-Sequenzierung eine Speziesidentifizierung für dieselben Isolate. Für 126 (99%) dieser 127 Isolate erzielten beide Identifizierungsmethoden auch dasselbe Ergebnis (siehe Tabelle 26, Anlage 5). Diese Isolate waren 12 *Corynebacterium spp.* und *Brevibacterium stationis*. Nur ein Isolat wies in MALDI-TOF MS ein anderes Ergebnis auf als in der 16S rDNA-Sequenzierung. Die MALDI-TOF MS identifizierte dieses Isolat als *Brevibacterium stationis* mit einem Value Score von 2,2 und die 16S rDNA-Sequenzierung

als *Corynebacterium ammoniagenes* mit einer maximalen Identifizierung von 100%. Es handelt sich um dasselbe Isolat (Nr. 22201) wie in Tabelle 13.

Mittels MALDI-TOF MS konnten insgesamt 147 Isolate als *C. xerosis* und mittels 16S rDNA-Sequenzierung insgesamt 78 Isolate als *C. xerosis* identifiziert werden, davon entsprachen 74 Isolate in beiden Methoden denselben Isolaten. Die Identifizierungspotentiale für diesen Keim unterschieden sich zwischen MALDI-TOF MS (50%) und 16S rDNA-Sequenzierung (95%) signifikant ($p < 0,001$).

Für die weiteren elf *Corynebacterium spp.* und *Brevibacterium stationis* der 126 Isolate, die in beiden Identifizierungsmethoden dasselbe Ergebnis erzielt hatten, waren keine signifikanten Unterschiede für die Identifizierungspotentiale zwischen diesen beiden Methoden zu finden.

4.2.2.3 Vergleich des API Coryne mit der 16S rDNA-Sequenzierung

Von den 329 Isolaten konnten 101 Isolate mit API Coryne und 146 Isolate mit 16S rDNA-Sequenzierung auf Speziesebene identifiziert werden. Das Maß der Übereinstimmung dieser beiden Methoden für die Identifizierung auf Speziesebene war mit $\kappa = 0,129$ jedoch schwach.

Aus diesen insgesamt 329 Isolaten resultierte in 55 Fällen sowohl bei API Coryne als auch bei der 16S rDNA-Sequenzierung eine Speziesidentifizierung für dieselben Isolate. Für 37 (67%) dieser 55 Isolate erzielten beide Identifizierungsmethoden auch dasselbe Ergebnis. Alle 37 Isolate waren derselben Spezies, *Corynebacterium xerosis*, zuzuordnen. Die restlichen 18 Isolate (33%) wiesen abweichende Identifizierungsergebnisse auf (siehe Tabelle 27, Anlage 5).

Die Identifizierungspotentiale für *C. xerosis* wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Methoden auf.

4.2.2.4 Vergleich der MALDI-TOF MS mit dem API Coryne

Von den 329 Isolaten, die mit allen drei Methoden untersucht wurden, konnten 259 Isolate mit MALDI-TOF MS und 101 Isolate mit API Coryne auf Speziesebene identifiziert werden. Das Maß der Übereinstimmung dieser beiden Methoden für die Identifizierung auf Speziesebene war mit $\kappa = 0,065$ jedoch schwach.

Aus diesen insgesamt 329 Isolaten resultierte in 86 Fällen sowohl bei MALDI-TOF MS als auch bei API Coryne eine Speziesidentifizierung für dieselben Isolate. Für 65 (76%) dieser 86 Isolate erzielten beide Identifizierungsmethoden auch dasselbe Ergebnis (siehe Tabelle 28, Anlage 5). 62 dieser Isolate wurden mit beiden Methoden als *Corynebacterium xerosis*, zwei

als *Corynebacterium accolens* und eines als *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* identifiziert.

Mittels MALDI-TOF MS konnten insgesamt 147 Isolate als *C. xerosis* und mittels API Coryne insgesamt 64 Isolate als *C. xerosis* identifiziert werden, davon entsprachen 62 Isolate in beiden Methoden denselben Isolaten. Die Identifizierungspotentiale für diesen Keim unterschieden sich zwischen MALDI-TOF MS (42%) und API Coryne (97%) signifikant ($p < 0,001$).

Für die weiteren zwei *Corynebacterium spp.* der 86 Isolate, die in beiden Identifizierungsmethoden dasselbe Ergebnis erzielt hatten, waren keine signifikanten Unterschiede für die Identifizierungspotentiale zwischen diesen beiden Methoden zu finden.

4.2.3 Identifizierungspotential eines zweistufigen Screeningverfahrens mit MALDI-TOF MS und 16S rDNA-Sequenzierung

Auf Genusebene wurden mit MALDI-TOF MS 90% der 329 untersuchten Isolate identifiziert. Bei den verbleibenden 33 Isolaten, bei denen mit MALDI-TOF MS keine Identifizierung möglich war, führte die 16S rDNA-Sequenzierung zu einer Identifizierung des Genus.

Auf Speziesebene konnten mit MALDI-TOF MS 79% der 329 untersuchten Isolate bestimmt werden. Bei den verbleibenden 70 Isolaten führte die 16S rDNA-Sequenzierung bei 16 Isolaten zur Speziesidentifizierung. Für 54 Isolate war somit bei einer Kombination dieser Methoden zumindest die Identifizierung auf Genusebene möglich.

Insgesamt gab es 113 Isolate, für die zwar eine Speziesidentifizierung durch MALDI-TOF MS, aber nicht anhand der 16S rDNA-Sequenzierung, vorgenommen werden konnte. Zur Überprüfung der MALDI-TOF MS Ergebnisse wurde hier für ausgewählte Isolate das bei *Corynebacterium spp.* zur Speziesidentifizierung übliche *rpoB*-Gen sequenziert. In allen Fällen stimmte das Ergebnis dieser *rpoB*-Sequenzierung mit dem Ergebnis der MALDI-TOF MS überein (siehe Tabelle 29, Anlage 5).

4.3 Zusammensetzung der nasalen *Corynebacterium*-Flora und verwandter Arten bei Schweinen

Auf das Vorkommen von *Corynebacterium spp.* und coryneformen Bakterien wurden insgesamt 41 Betriebe mit insgesamt 411 Tieren beprobt. Alle 41 Betriebe waren zu dem Zeitpunkt der Beprobung positiv für *Corynebacterium spp.* und coryneforme Bakterien.

Von den 411 untersuchten Tieren wurden bei 100% der Tiere *Corynebacterium spp.* und bei 68,4% (281 Tiere) coryneforme Bakterien nachgewiesen.

Im weiteren Verlauf des Ergebnisteiles wurden Proben als positiv für *Corynebacterium spp.* oder coryneforme Bakterien gewertet, wenn ein positives MALDI-TOF MS Ergebnis mit einem Score Value größer gleich zwei erzielt wurde.

4.3.1 Unterschiedliche Altersklassen

Es wurden insgesamt 411 Nasentupfer von Sauen, Ferkeln und Mastschweinen auf das Vorkommen von *Corynebacterium spp.* und coryneformer Bakterien untersucht.

Bei allen beprobten Tieren konnten *Corynebacterium spp.* gefunden werden. Von den 411 beprobten Tieren waren 68,4% positiv für coryneforme Bakterien. Dabei unterschieden sich die Altersklassen signifikant voneinander ($p=0,0235$). Das geringste Vorkommen dieser Keime lag mit 57% bei den Altsauen. Nach der Bonferroni-Korrektur konnte der signifikante Unterschied der Altersstufen für das Vorkommen von coryneformen Bakterien zwischen den Altsauen (57%) und den Aufzuchtferkeln (80%) erkannt werden ($p=0,0016$) (siehe Tabelle 14).

In der nachfolgenden Tabelle ist die Aufteilung der *Corynebacterium spp.*- bzw. coryneformen Bakterien-positiven Tiere entsprechend ihres Alters zu finden.

Tabelle 14: Aufteilung der positiven Tiere entsprechend ihres Alters

Altersstufen	Anzahl aller Tiere je Altersstufe	<i>Corynebacterium spp.</i> -positive Tiere	coryneforme Bakterien-positive Tiere
Saugferkel bis 4 Wo.	82	82 (100%)	57 (70%)
Aufzuchtferkel bis 12 Wo.	81	81 (100%)	65 (80%)
Masttiere bis 24 Wo.	159	159 (100%)	105 (66%)
Jungsauen bis 30 Wo.	15	15 (100%)	12 (80%)
Altsauen über 30 Wo.	74	74 (100%)	42 (57%)

Die Verteilung der isolierten Spezies auf die unterschiedlichen Altersstufen verdeutlicht Abbildung 10 (siehe auch Tabelle 30, Anlage 6). Die am häufigsten vorkommenden Keime waren *Corynebacterium xerosis* und *Brevibacterium stationis*. Das Auftreten von *C. xerosis* wies keine besonderen Verteilungsmerkmale in den Altersklassen auf. *Brevibacterium stationis* zeigte einen signifikanten Unterschied bezüglich des Auftretens in den verschiedenen Altersstufen, wobei dieser Keim mit 80% am ehesten bei Jungsauen zu finden war ($p=0,0099$). Eine genauere Betrachtung des Vorkommen von *Brevibacterium stationis* mit Hilfe der Bonferroni-Korrektur ergab, dass der signifikante Unterschied in den unterschiedlichen Altersgruppen zwischen Altsauen (53%) und Aufzuchtferkeln (75%) lag ($p=0,0033$) (siehe Abbildung 10 und Abbildung 11).

Eine weitere *Corynebacterium* sp., die in allen Altersgruppen gefunden werden konnte, war *Corynebacterium confusum*. Innerhalb der Altersklassen war ein signifikanter Unterschied im Vorkommen dieses Keimes ($p=0,0008$). *C. confusum* war aus Proben von Masttieren bzw. Jungsauen mit 20% bzw. 13% und mit jeweils 5% von Aufzuchtferkeln und Altsauen zu isolieren. Signifikante Unterschiede im Vorkommen von *C. confusum* in den beprobten Altersstufen zeigten sich nach genauerer Betrachtung mit der Bonferroni-Korrektur zwischen Masttieren und Aufzuchtferkeln ($p=0,0018$) und Masttieren und Altsauen ($p=0,0038$).

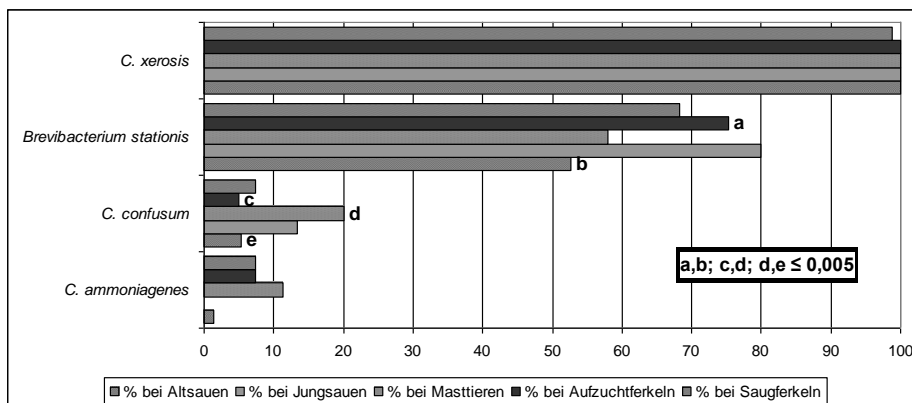


Abbildung 10: Zusammensetzung der nasalen *Corynebacterium*-Flora und verwandter Arten bei Schweinen unterschiedlicher Altersklassen
(*Corynebacterium* spp. mit einer Nachweisrate unter 10% sind Tabelle 30, Anlage 6 zu entnehmen)

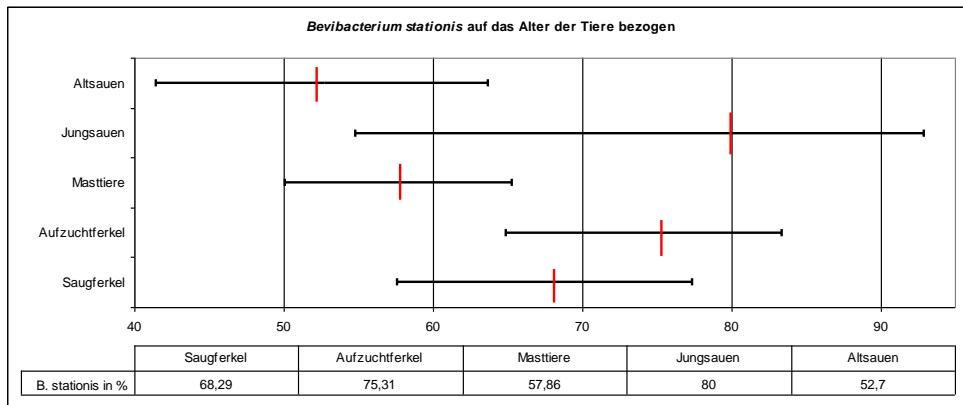


Abbildung 11: Vorkommen von *Brevibacterium stationis* mit Konfidenzintervallen bezogen auf die unterschiedlichen Altersklassen

4.3.2 Unterschiedliche Betriebsarten

Bei der Betrachtung der beprobten Tiere aufgeteilt in die einzelnen Betriebsarten konnten für das Vorkommen von *Corynebacterium spp.* und coryneforme Bakterien keine Unterschiede zwischen den einzelnen Betriebsformen erkannt werden. Die Verteilung von *Corynebacterium spp.* mit 100% und von coryneforme Bakterien mit 68% bis 70% auf die einzelnen Betriebsarten war somit homogen. In Tabelle 15 ist die Aufteilung der positiven Tiere entsprechend der Betriebsarten Ferkelerzeuger, Mastbetrieb und geschlossenes System zusammengestellt.

Tabelle 15: Aufteilung der positiven Tiere nach den einzelnen Betriebsarten

Betriebsarten	Anzahl aller Tiere je Betriebsart	<i>Corynebacterium spp.</i> -positive Tiere	coryneforme Bakterien-positive Tiere
Ferkelerzeuger	160	160 (100%)	108 (67,5%)
Mastbetrieb	132	132 (100%)	92 (70%)
geschlossenes System	119	119 (100%)	81 (68%)

Aufgeteilt nach den Betriebsarten, waren die am häufigsten vorkommenden Stämme *Corynebacterium xerosis*, *Brevibacterium stationis*, *Corynebacterium confusum* und *Corynebacterium ammoniagenes*. Unterschiede in der Häufigkeit des Auftretens dieser Keime in den drei Betriebsformen traten für *C. confusum* mit $p=0,0003$ und *C. ammoniagenes* mit $p=0,0055$ auf. *C. confusum* war überwiegend in Mastbetrieben und geschlossenen Systemen jeweils zu 17%, in Ferkelerzeugerbetrieben zu 4% anzutreffen. Dies ergab nach der

Bonferroni-Korrektur jeweils einen signifikanten Unterschied von $p=0,0002$ zwischen dem Vorkommen von *C. confusum* in Ferkelerzeugerbetrieben und Mastbetrieben bzw. geschlossenen Systemen.

C. ammoniagenes war nach genauerer Betrachtung signifikant häufiger in Mastbetrieben (14%) als in Ferkelerzeugerbetrieben (4%) vorzufinden ($p=0,0049$) (siehe Abbildung 12 und Tabelle 31, Anlage 6).

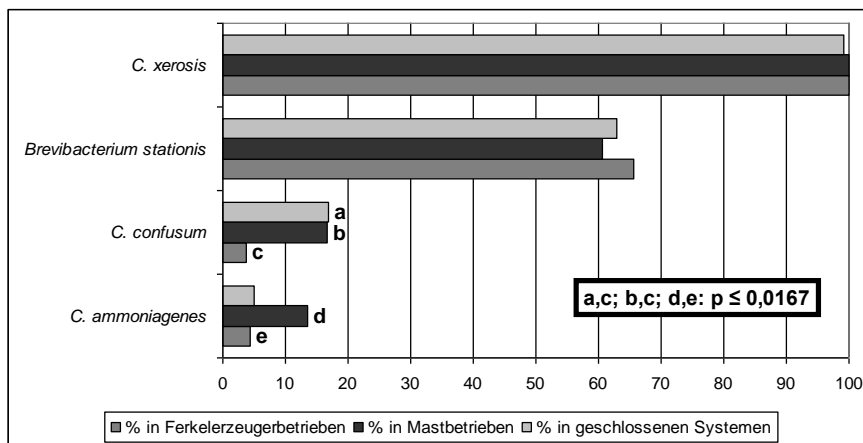


Abbildung 12: Zusammensetzung der nasalen *Corynebacterium*-Flora und verwandter Arten bei Schweinen unterschiedlicher Betriebsarten
(*Corynebacterium* spp. mit einer Nachweisrate unter 10% sind Tabelle 31, Anlage 6 zu entnehmen)

4.3.3 Unterschiedliche Regionen

Zur Ermittlung regionaler Unterschiede für das Auftreten von *Corynebacterium* spp. wurden die beprobten 41 Betriebe getrennt nach den jeweiligen Regierungsbezirken betrachtet, in denen sie angesiedelt sind. Alle je Regierungsbezirk untersuchten Betriebe waren jeweils zu 100% positiv für *Corynebacterium* spp. und coryneforme Bakterien. Zudem zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den einzelnen Regierungsbezirken zwischen dem Vorkommen von *Corynebacterium* spp. und coryneformen Bakterien.

Für die 411 beprobten Tiere gab es für das Vorkommen coryneformer Bakterien insgesamt signifikante Unterschiede bezüglich der Einteilung nach den Regierungsbezirken. Während in Mittelfranken mit 84% am häufigsten coryneforme Bakterien isoliert werden konnten, waren sie in Niederbayern mit 56% am seltensten anzutreffen. Signifikante Unterschiede im Vorkommen coryneformer Bakterien traten zwischen Niederbayern und Mittelfranken mit $p=0,0007$ und zwischen Niederbayern und der Oberpfalz mit $p=0,0042$ auf. Für

Corynebacterium spp. konnten keine entsprechenden Unterschiede erkannt werden (siehe Abbildung 13 und Tabelle 32, Anlage 6).

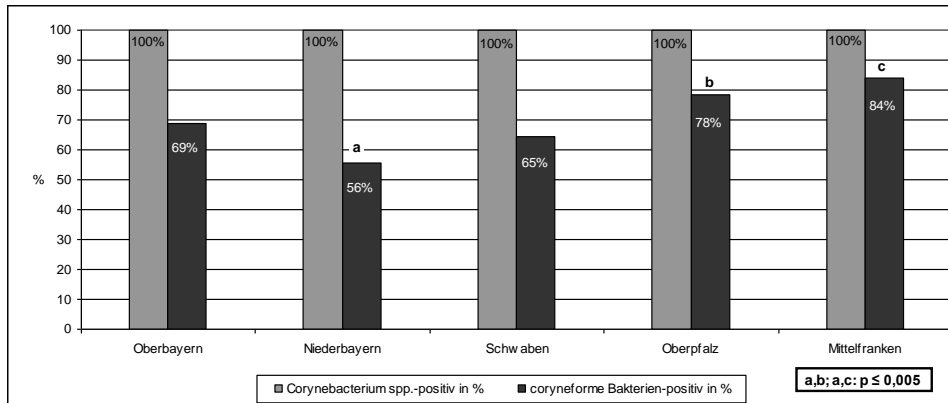


Abbildung 13: Aufteilung der positiven Tiere nach den beteiligten Regierungsbezirken

Wie Abbildung 14 (siehe auch Tabelle 33, Anlage 6) zeigt, waren *Corynebacterium xerosis* und *Brevibacterium stationis* die vorherrschenden Keime in allen untersuchten Regionen, gefolgt von *Corynebacterium confusum*, *Corynebacterium ammoniagenes* und *Corynebacterium casei*. Für *Brevibacterium stationis*, *C. confusum* und *C. casei* gab es deutliche Unterschiede in der Häufigkeit des Auftretens in den verschiedenen Regierungsbezirken: *Brevibacterium stationis* ($p=0,0169$) wurde im Vergleich zu den anderen Regierungsbezirken am häufigsten in Mittelfranken mit 78%, *C. confusum* ($p=0,0241$) in Schwaben mit 21% und *C. casei* ($p=0,0458$) in Oberbayern mit 9% isoliert.

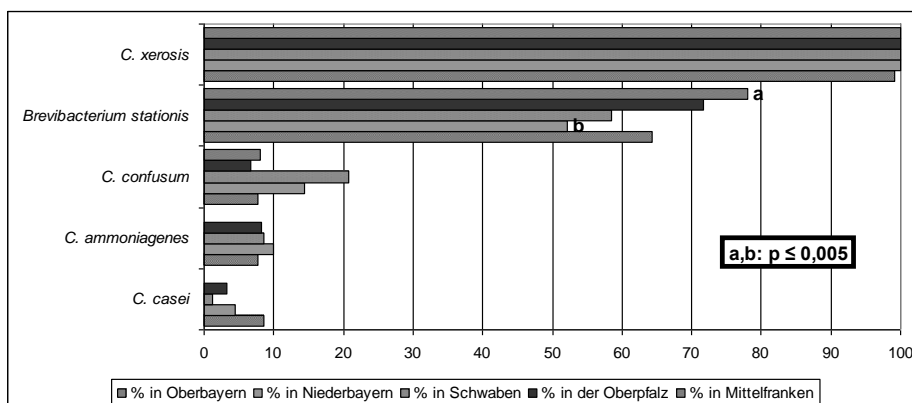


Abbildung 14: Zusammensetzung der nasalen *Corynebacterium*-Flora und verwandter Arten bei Schweinen unterschiedlicher Regionen (*Corynebacterium spp.* mit einer Nachweisrate unter 10% sind Tabelle 33, Anlage 6 zu entnehmen)

Wie Abbildung 14 und Abbildung 15 zu entnehmen sind, hatte *Brevibacterium stationis* bezogen auf die beprobten Regierungsbezirke einen signifikanten Unterschied im Vorkommen dieses Keimes zwischen Mittelfranken und Niederbayern ($p=0,0027$). Zudem konnte *Brevibacterium stationis* im Vergleich zu den anderen beprobten Regierungsbezirken am häufigsten in Mittelfranken (78%) und am seltensten in Niederbayern (52%) isoliert werden.

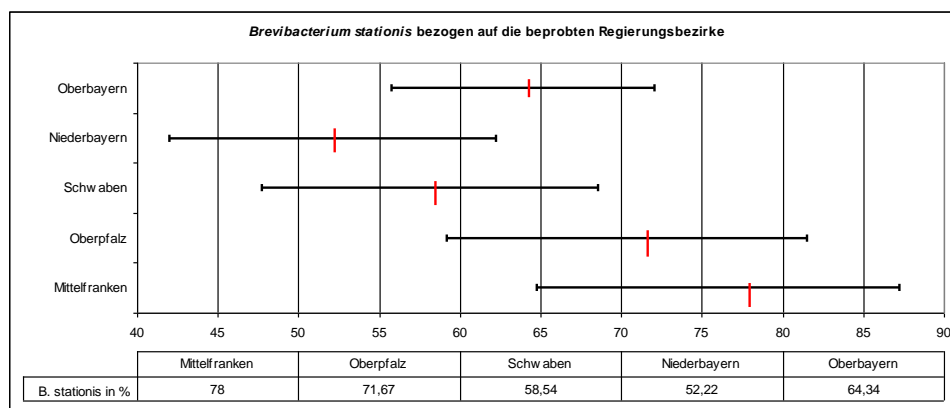


Abbildung 15: Vorkommen von *Brevibacterium stationis* mit Konfidenzintervallen bezogen auf die unterschiedlichen Regionen

4.4 Zusammensetzung der nasalen und tonsillären *Corynebacterium*-Flora bei Schweinen

Zum Vergleich der Nachweisrate von *Corynebacterium spp.* und verwandter Arten wurden 17 Ferkeln sowohl Nasen- als auch Tonsillentupfer entnommen. In beiden Probenahmeverfahren konnten zu 100% *Corynebacterium spp.* und coryneforme Bakterien zu 53% in den Nasentupfer- und zu 29% in den Tonsillentupferproben gefunden werden. Die drei am häufigsten vertretenen Spezies, *Corynebacterium xerosis*, *Brevibacterium stationis* und *Corynebacterium ammoniagenes*, waren in Proben beider Entnahmestellen zu isolieren. *C. casei*, *C. testudinoris* und *C. flaveszens* wurden in diesem Teil der Studie ausschließlich aus Nasentupferproben und *C. amycolatum*, *C. camporealensis* und *C. confusum* ausschließlich aus Tonsillentupferproben isoliert.

Zur Veranschaulichung der Verteilung und Zusammensetzung der nasalen und tonsillären *Corynebacterium*-Flora bei Schweinen dienen Abbildung 16 und Tabelle 34, Anlage 6.

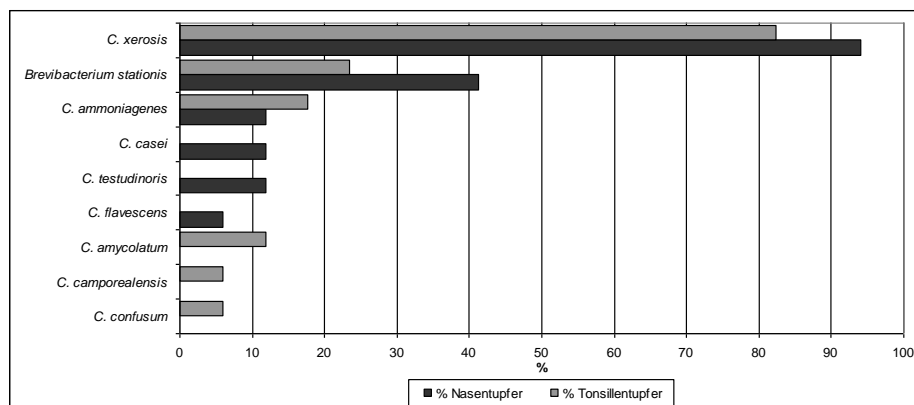


Abbildung 16: Darstellung der nasalen und tonsillären *Corynebacterium*-Flora bei Schweinen

In den Nasentupferproben kam *C. xerosis* zu 94%, *Brevibacterium stationis* zu 41% und *C. ammoniagenes* zu 12% vor. Aus den Tonsillentupferproben wurde *C. xerosis* zu 82%, *Brevibacterium stationis* zu 24% und *C. ammoniagenes* zu 18% isoliert. Trotz unterschiedlicher Entnahmetechniken sind die Unterschiede für das Vorkommen eines Keimes nicht signifikant (siehe Abbildung 17).

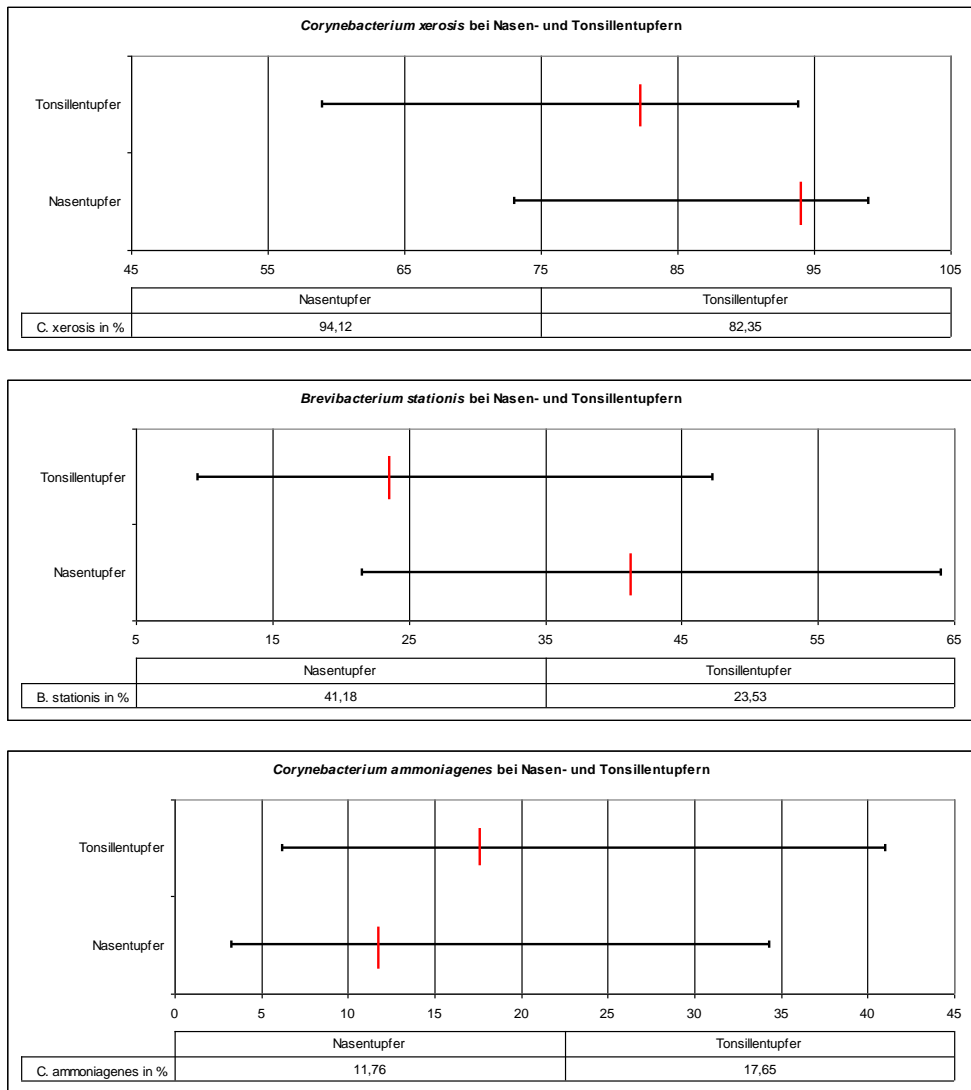


Abbildung 17: Vorkommen der drei häufigsten Stämme bei Nasen- und Tonsillentupferproben mit Konfidenzintervallen

4.5 Abhängigkeit der Zusammensetzung der nasalen *Corynebacterium*-Flora bei Schweinen von bestimmten Betriebsparametern

Wie Tabelle 16 zu entnehmen ist, hatten 22% der Betriebe den Hygienestatus III mit einem Punktwert zwischen neun bis 12 Punkten, 76% den Hygienestatus II mit einem Punktwert zwischen fünf bis acht Punkten und 2% den Hygienestatus I mit einem Punktwert zwischen null bis vier Punkten.

Tabelle 16: Einteilung der Betriebe anhand des Hygienescores in die drei Hygienestatus

Hygienestatus	Punkteinteilung	Jeweilige Anzahl der Betriebe
I	0-4	1 Betrieb (2%)
II	5-8	31 Betriebe (76%)
III	9-12	9 Betriebe (22%)

Die Hygienestatus hatten keinen signifikanten Einfluss auf das Vorkommen von *Corynebacterium spp.* und coryneformen Bakterien. Auch wenn man den Hygienescore für die einzelnen Betriebsarten betrachtete, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (siehe Abbildung 18 und Tabelle 35, Anlage 6).

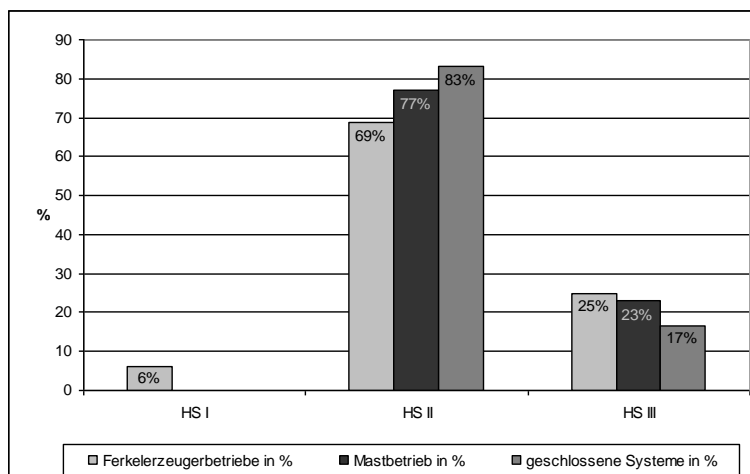


Abbildung 18: Anteil der 41 Betriebe eingeteilt in die drei Hygienestatus und die Betriebsarten

Das Auftreten von *Corynebacterium spp.* und coryneformen Bakterien bei den beprobten 411 Tieren eingeteilt nach den Hygienestatus der Betriebe ließ keine signifikanten Unterschiede erkennen.

Auf das Vorkommen der unterschiedlichen Keimarten hatten die Hygienestatus keinen Einfluss. Weder für das Auftreten der zwei häufigsten Keime *Corynebacterium xerosis* und *Brevibacterium stationis* noch für die zweithäufigsten Keime *Corynebacterium confusum* und *Corynebacterium ammoniagenes* konnten signifikante Zusammenhänge mit den Hygienestatus erkannt werden.

Abbildung 19 und Tabelle 36, Anlage 6 kann das in den drei Hygienestatus vorkommende Keimspektrum entnommen werden.

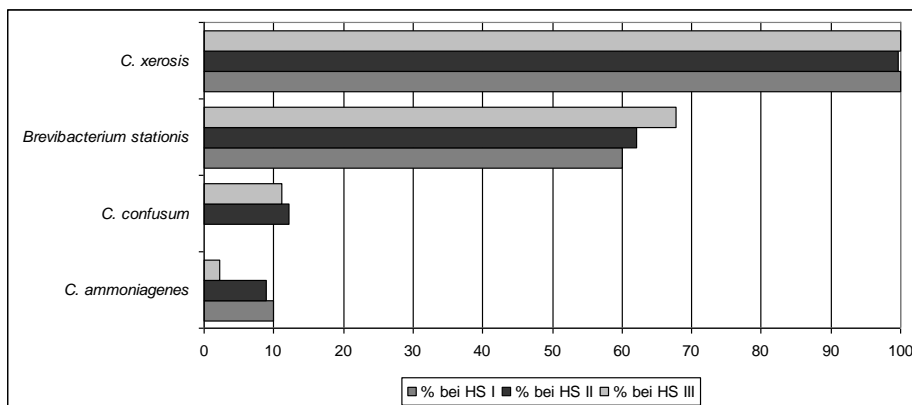


Abbildung 19: Keimspektrum aufgeteilt nach den Hygienestatus
(*Corynebacterium spp.* mit einer Nachweisrate unter 10% sind Tabelle 36, Anlage 6 zu entnehmen)

4.6 Zusammensetzung der nasalen *Corynebacterium*-Flora und verwandter Arten von Betriebsangehörigen schweinehaltender Betriebe

Aus den 41 Betrieben erklärten sich in 27 Betrieben insgesamt 30 Betriebsangehörige bereit, sich Nasentupferproben entnehmen und diese auf das Vorkommen von *Corynebacterium spp.* und coryneforme Bakterien untersuchen zu lassen. Daraus ergab sich, dass bei 97% der 30 beprobten Personen *Corynebacterium spp.* nachweisbar waren. Coryneforme Bakterien konnten bei insgesamt sieben Personen (23%) der 30 beprobten Betriebsangehörigen gefunden werden.

Alle 41 Betriebe waren zum Zeitpunkt der Studie *Corynebacterium*- und coryneforme Bakterien-positiv. Betrachtet man die drei Betriebsformen - Ferkelerzeugerbetrieb, Mastbetrieb und geschlossenes System - getrennt voneinander, zeigt sich, dass alle Ferkelerzeugerbetriebe *Corynebacterium*- und coryneforme Bakterien positiv waren. Alle 15 beprobten Betriebsangehörigen dieser Betriebsform waren positiv für Corynebakterien und zu 27% für coryneforme Bakterien. Die 13 Mastbetriebe aller 41 beprobten Betriebe waren ebenfalls *Corynebacterium*- und coryneforme Bakterien positiv. Alle acht der untersuchten Personen aus Mastbetrieben waren positiv für *Corynebacterium spp.*, 25% davon für coryneforme Bakterien. Die 12 beprobten geschlossenen Systeme waren ebenfalls alle *Corynebacterium*- und coryneforme Bakterien positiv. Davon waren 86% der sieben beprobten Betriebsangehörigen *Corynebacterium*-positive und 14% positiv für coryneforme Bakterien.

Die nachfolgende Tabelle 17 soll die Verteilung der für Corynebakterien- und coryneforme Bakterien-positiven Personen auf die jeweiligen Betriebsarten verdeutlichen.

Tabelle 17: Verteilung der *Corynebacterium*- und coryneforme Bakterien-positiven Personen und Betriebe

Betriebsart	Anzahl beprobter Betriebe	Anzahl beprobter Personen	<i>Corynebacterium spp.</i> -positive Betriebe	<i>Corynebacterium spp.</i> -positive Personen	coryneforme Bakterien-positiv Betriebe	coryneforme Bakterien-positiv Personen
Ferkelerzeuger	16	15	16 (100%)	15 (100%)	16 (100%)	4 (27%)
Mastbetrieb	13	8	13 (100%)	8 (100%)	13 (100%)	2 (25%)
Geschloss. System	12	7	12 (100%)	6 (86%)	12 (100%)	1 (14%)
insgesamt	41	30	41 (100%)	29 (97%)	41 (100%)	7 (23%)

Die mit MALDI-TOF MS identifizierte Bakterienflora kann Tabelle 18 entnommen werden. Die drei am häufigsten isolierten Keime waren *Corynebacterium xerosis* (87%), *Corynebacterium confusum* (23%) und *Brevibacterium stationis* (23%). Das höhere Vorkommen von *C. xerosis* im Vergleich zu *C. confusum* und *B. stationis* war dabei statistisch nicht signifikant (jeweils $p=0,236$).

Tabelle 18: Die nasale *Corynebacterium*-Flora von Betriebsangehörigen schweinehaltender Betriebe identifiziert durch MALDI-TOF MS

Spezies	Anzahl der pos. Menschen (n=30) je gefundener Spezies
<i>C. xerosis</i>	26 (87%)
<i>C. confusum</i>	7 (23%)
<i>Brevibacterium stationis</i> *	7 (23%)
<i>C. accolens</i>	4 (13%)
<i>C. propinquum</i>	3 (10%)
<i>C. camporealensis</i>	2 (7%)
<i>C. ammoniagenes</i>	1 (3%)
<i>C. amycolatum</i>	1 (3%)
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	1 (3%)

* Es wird vorgeschlagen *Brevibacterium stationis* dem Genus *Corynebacterium* zuzuordnen (BERNARD et al. 2010)

4.7 Vorkommen toxinproduzierender *Corynebacterium* spp.

Weder in den 411 porcinen noch in den 30 humanen Proben wurden die potentiell toxinproduzierenden Spezies *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* oder *C. pseudotuberculosis* nachgewiesen.

4.8 Rolle von *Corynebacterium ulcerans* bei einem Ausbruchsgeschehen in einem landwirtschaftlichen Betrieb

Im Juli 2010 wurde zusätzlich zu den 41 Betrieben ein weiterer Schweine haltender Betrieb in Baden-Württemberg beprobt. Grund dafür war die Isolierung eines Toxin-positiven *C. ulcerans* Stammes aus einer Wundinfektion am Unterschenkel des 58-jährigen Landwirtes dieses Betriebes.

Um die mögliche Infektionsquelle ermitteln zu können, wurde in Zusammenarbeit mit dem zuständigen Gesundheitsamt und Veterinäramt eine Umgebungsuntersuchung durchgeführt. Dazu wurden Rachenabstriche von der Ehefrau, dem behandelnden Hausarzt und drei Arzthelferinnen genommen. Alle diese Personen waren frei von *C. ulcerans*.

Der 32-jährige Sohn stellte ebenfalls einen Tonsillen- und einen Nasenabstrich zur Verfügung und aufgrund der Erkenntnisse von BERGER et al. (2011) über Katzen als mögliche Infektionsquelle von *Corynebacterium ulcerans*, wurde auch die Hauskatze einer Beprobung der Tonsillen unterzogen. Jedoch wurde in keiner dieser Proben *C. ulcerans* nachgewiesen.

Der Verdacht bestand, dass es sich um einen ähnlichen Fall wie im Dezember 2007 (SCHUHEGGER et al. 2009) handeln könnte, bei dem die mögliche Infektionsquelle von *C. ulcerans* ein Schwein des eigenen Betriebes war. Folglich wurde zusätzlich 83 Schweinen des zu diesem Zeitpunkt 139 Tiere umfassenden Betriebes Nasenabstriche entnommen (siehe 3.3). Abbildung 20 zeigt eine Skizze der Stallungen und verdeutlicht die flächendeckende Beprobung der Schweine in den einzelnen Stallbereichen. Bei keinem der beprobten Schweine wurde *C. ulcerans* nachgewiesen.

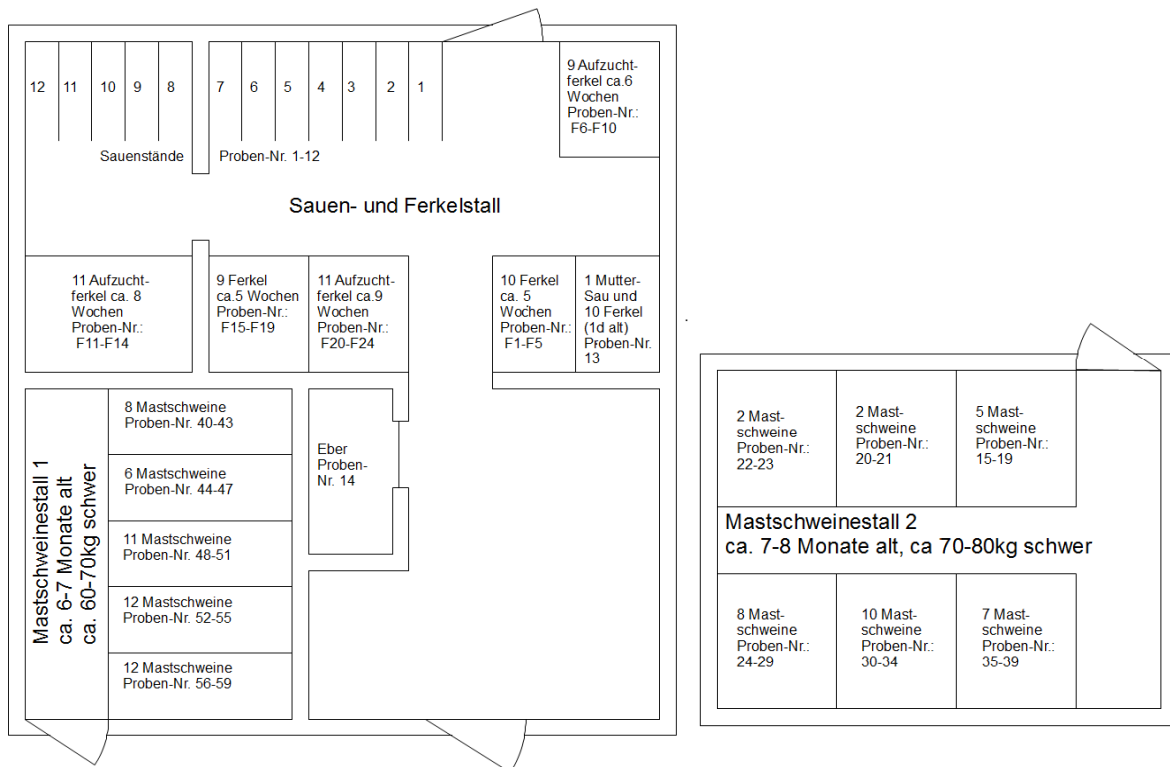


Abbildung 20: Skizze der Stallungen und der Verteilung der beprobten Tiere

In Tabelle 19 ist eine kurze Übersicht über die in diesem Betrieb isolierten Keime zusammengestellt, die bei den 83 beprobten Tieren gefunden wurden. Auch hier, wie bereits in den anderen 41 beprobten Betrieben waren *Corynebacterium xerosis* und *Brevibacterium stationis* am häufigsten anzutreffen.

Tabelle 19: Isolierte *Corynebacterium* spp. und coryneforme Bakterien bei einem Ausbruchsgeschehen in einem landwirtschaftlichen Betrieb

Spezies	Anzahl der pos. Schweine (n=83) je gefundener Spezies
<i>C. xerosis</i>	57 (69%)
<i>Brevibacterium stationis</i> *	46 (55%)
<i>Brachybacterium faecium</i>	4 (5%)
<i>C. amycolatum</i>	2 (2%)
<i>C. casei</i>	2 (2%)
<i>C. freneyi</i>	2 (2%)
<i>C. minutissimum</i>	2 (2%)
<i>C. camporealensis</i>	1 (1%)
<i>C. confusum</i>	1 (1%)
<i>C. glutamicum</i>	1 (1%)
<i>C. urealyticum</i>	1 (1%)

* Es wird vorgeschlagen *Brevibacterium stationis* dem Genus *Corynebacterium* zuzuordnen (BERNARD et al. 2010)

5 Diskussion

5.1 Methodenvergleich

5.1.1 Identifizierungspotential verschiedener Methoden für coryneforme Isolate

In der vorliegenden Arbeit weist MALDI-TOF MS mit 79% für alle Isolate (n=329) das größte Potential zur Speziesidentifizierung auf, die 16S rDNA-Sequenzierung folgt mit 44% und API Coryne bildet mit 31% das Schlusslicht zur Identifizierung der Isolate auf Speziesebene. Signifikante Unterschiede für die Identifizierung auf Speziesebene finden sich dabei zwischen MALDI-TOF MS und 16S rDNA-Sequenzierung ($p<0,001$), zwischen MALDI-TOF MS und API Coryne ($p<0,001$) und zwischen API Coryne und 16S rDNA-Sequenzierung ($p=0,0003$). Gleichzeitig liegt der weder auf Spezies- noch auf Genusebene identifizierbare Anteil für den API Coryne mit 35% am höchsten, die 16S rDNA-Sequenzierung kann 14% und die MALDI-TOF MS 10% aller Isolate nicht identifizieren.

Ein wesentlicher Grund für die geringe Speziesidentifizierung des API Coryne Systems könnte darin begründet sein, dass dieses biochemische Verfahren zur Identifizierung von relevanten Keimen in der Humanmedizin entwickelt wurde und die Datenbank der apiweb™ Identifizierungssoftware folglich in erster Linie humanmedizinisch relevante Spezies enthält (FUNKE et al. 1997b; KONRAD et al. 2010). In den eigenen Untersuchungen wurden jedoch zum überwiegenden Teil porcine Isolate (n=158) untersucht, die schon aufgrund des natürlichen Bedürfnisses von Schweinen, Umwelt und Buchtgenossen mit Maul und Nase zu „begreifen“, neben tierspezifischen auch zur Umweltflora gehörende Corynebakterien und coryneforme Bakterien sein können.

Zum anderen weist die Datenbank des API Coryne Systems Lücken auf. Selten von klinischen Proben isolierte Spezies wie beispielsweise *C. ammoniagenes*, *C. camporealensis*, *C. casei*, *C. confusum* und *C. xerosis* sind nicht in der Datenbank enthalten oder wurden bei Updates der Datenbank wieder gestrichen (FUNKE et al. 1997b; KONRAD et al. 2010).

Aufgrund der lückenhaften und der auf ein humanmedizinisch relevantes Keimspektrum zugeschnittenen Datenbank der apiweb™ Identifizierungssoftware konnten FUNKE et al. (1997b) in ihrer Studie beobachten, dass die Software falsche Identifizierungen für Stämme nannte, die nicht in der Datenbank enthalten sind. Man erhält demzufolge falsch positive Ergebnisse, da ausschließlich den abgelesenen API Codes entsprechende, in der Datenbank enthaltene Keime als Ergebnis ausgegeben werden. Darüber hinaus stehen für die biochemische Differenzierung einer außerordentlich gattungs- und artenreichen Keimgruppe

im API Coryne lediglich 21 Reaktionen zur Verfügung, so dass mit dieser eingeschränkten Zahl biochemischer Parameter eine nicht ausreichende Trennschärfe zu erzielen ist. Entsprechend erwähnen FUNKE et al. (1997b) in ihrer Evaluation des API Coryne auch das eingeschränkte Identifizierungspotential durch die Anwendung des API Coryne Systems allein. Zur eindeutigen Identifizierung mussten in 55,1% der Fälle noch weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden, was in der vorliegenden Arbeit unterlassen wurde.

FUNKE et al. (1997b) beobachten in ihrer Evaluation des API Coryne Systems auch, dass bei einigen Spezies die Fermentationsreaktion von Kohlehydraten erst nach einer verlängerten Inkubationszeit positiv reagierten und daher für taxonomische Untersuchungen eine 24h-stündige Bebrütungsdauer nicht ausreichend sein könnte. In den Herstellerangaben wird eine 24- bis 48-stündige Inkubation vorgeschlagen. Jedoch werden keine genaueren Angaben darüber gemacht, in welchen Fällen 24h Bebrütungsdauer ausreichend sind oder unter welchen Umständen das API Coryne System zur korrekten Identifizierung 48 h bebrütet werden sollte. Daher ist es sehr gut möglich, dass selbst wenn die Mikroröhrchen des API Coryne Streifens vorschriftsmäßig befüllt, bebrütet und für das Ablesen des API Codes von diesem API Coryne Streifen vorbereitet werden und das Ablesen des Ergebnisses eindeutig ist, trotzdem falsche Ergebnisse erzielt werden können. Dies zeigt, dass das API Coryne System allein zur Erstellung einer Übersicht über die nasale *Corynebacterium*-Flora bei Schweinen eine wenig geeignete Methode darstellt.

Die 16S rDNA-Sequenzierung gilt als Goldstandard für die molekularbiologische Identifizierung von Bakterien im allgemeinen, dennoch weist sie mit 44% auf Speziesebene identifizierten Isolate und 14% nicht identifizierten Isolaten von allen Isolaten (n=329) ebenfalls ein geringeres Identifizierungspotential als MALDI-TOF MS auf (STACKEBRANDT und EBERS 2006; FUNKE 2009; CHERKAOUI et al. 2010; BENAGLI et al. 2011). Nach STACKEBRANDT und EBERS (2006) sollten 98,7-99% Homologie als Schwellenwert für eine eindeutige Bestimmung von Isolaten auf Speziesebene verbindlich sein. In der vorliegenden Studie wurde eine Homologie von 98% als Schwellenwert für die Identifizierung auf Speziesebene angewendet. Dennoch konnten insgesamt nur 146 (44%) Isolate mit der 16S rDNA-Sequenzierung auf Speziesebene identifiziert werden. Grund hierfür könnte die Tatsache sein, dass nicht nur humane, sondern auch porcine Isolate bearbeitet wurden und die Sequenzen porciner Isolate entweder nicht genügend humanen Sequenzen ähneln oder es sich um bisher molekularbiologisch nicht bearbeitete Keime handelt, deren Sequenzen in der NCBI-Datenbank nicht vorliegen.

Zudem ist die 16S rDNA-Sequenzierung eine sehr zeitaufwendige und kostspielige Methode, was dazu führen könnte, dass die MALDI-TOF MS die Methode der Wahl für die Identifizierung klinisch- und umweltrelevanter Keime werden könnte (SENG et al. 2009; BENAGLI et al. 2011; BIZZINI et al. 2011). Voraussetzung ist auch hier das Vorliegen einer genügend großen und ausreichend diversifizierten Vergleichsdatenbank, die neben humanen auch veterinärmedizinische und Umweltisolate enthält.

Während der Anteil der erfolgreichen Identifizierungen auf Speziesebene bei allen drei Methoden unabhängig davon ist, ob die Isolate porcinen oder humanen Ursprungs sind, wird deutlich, dass die Quelle der Isolate bei der 16S rDNA-Sequenzierung einen Einfluss darauf hat, ob ein Isolat noch auf Genusebene oder nicht mehr identifizierbar ist. So sind von den humanen Isolaten 53% nur auf Genusebene und 4% gar nicht mit der 16S rDNA-Sequenzierung identifizierbar. Der Anteil der porcinen, nur auf Genusebene identifizierten Isolate liegt bei 29% und 25% der Isolate können mit der 16S rDNA-Sequenzierung gar nicht identifiziert werden.

Der hohe Anteil an porcinen, nicht identifizierten Isolaten könnte damit zusammenhängen, dass es sich um bisher molekularbiologisch noch nicht bearbeitete Umweltkeime oder nur bei Tieren vorkommende Keime handelt, die bislang nicht näher bestimmt wurden und nicht in der NCBI-Datenbank enthalten sind. Zur genaueren Identifizierung und zur Lösung dieses Problems müsste die gesamte DNA dieser Keime sequenziert werden (ROUX et al. 2004; KHAMIS et al. 2005; FUNKE und BERNARD 2007).

Die MALDI-TOF MS kann in der vorliegenden Arbeit 79% aller Isolate auf Speziesebene identifizieren. Von allen porcinen Isolaten kann sie 78% der Isolate und von allen humanen 79,5% der Isolate auf Speziesebene identifizieren, was zeigt, dass die humane oder porcine Herkunft der Isolate keinen großen Einfluss hat.

Im Vergleich zu anderen Studien scheint die MALDI-TOF MS hier ein schlechteres Identifizierungspotential auf Speziesebene zu haben, denn in anderen Studien konnten bereits Speziesidentifizierungen über 80% erzielt werden, meist liegen sie sogar über 90%, aber auch Speziesidentifizierungen von 100% konnten in anderen Studien erzielt werden (BARBUDDHE et al. 2008; NAGY et al. 2009; BIZZINI et al. 2010; VAN VEEN et al. 2010; BESSÈDE et al. 2011). Jedoch muss beachtet werden, dass es sich in diesen Studien um die Identifizierung humanpathogener Keime und um eine Auswahl verschiedener Genera, wie zum Beispiel *Bacteroides*, *Escherichia*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pneumococcus* und *Pseudomonas*, handelte. In der vorliegenden Studie wurde jedoch eine gattungs- und artenreiche Bakteriengruppe mit zum Teil engen Verwandtschaftsbeziehungen,

nämlich *Corynebacterium spp.* und coryneforme Bakterien, untersucht, wobei Keime humanen und porcinen Ursprungs und gegebenenfalls Umweltisolate überprüft wurden. Die Tatsache, dass die Datenbank der MALDI-TOF MS ihren Schwerpunkt auf humanpathogene Erreger legt (NAGY et al. 2009; BENAGLI et al. 2011; BIZZINI et al. 2011) könnte ein Grund für das vergleichsweise schlechtere Abschneiden der MALDI-TOF MS bei der Speziesidentifizierung bei porcinen Isolaten mit 78% sein. Ebenso sind die 79,5% der humanen, auf Speziesebene identifizierten Isolate damit zu begründen, dass in der vorliegenden Arbeit das generelle Vorkommen von allen Corynebakterien in der Nasenflora des Menschen und nicht nur pathogener Corynebakterien untersucht wurde. Des Weiteren lässt die ähnliche Identifizierung auf Speziesebene der porcinen Isolate mit 78% und der humanen Isolate mit 79,5% und der Vergleich der Spezieszusammensetzung porciner und humaner Isolate vermuten, dass es sich bei den humanen Isolaten auch um Isolate porcinen Ursprungs handeln könnte (siehe auch Abschnitt 5.6).

Die Datenbank der MALDI-TOF MS enthielt zum Zeitpunkt der Studie 139 Referenzspektren für insgesamt 71 *Corynebacterium spp.*. Häufig findet sich für eine Spezies nur ein Referenzspektrum in der Datenbank wie beispielsweise für *C. xerosis*, *C. confusum* und *Brevibacterium stationis*, was für eine gute Identifizierung nicht von Vorteil ist. Laut SENG et al. (2009) sollten für eine gute Identifizierung mindestens fünf und idealer Weise zehn Referenzspektren in der Datenbank enthalten sein. Folglich könnte zusätzlich zu der lückenhaften Datenbank und angesichts der vorrangigen Aufnahme klinisch relevanter Humanpathogene die zu geringe Anzahl der Referenzspektren eine Rolle bei der im Vergleich zu anderen Studien relativ schlechten Identifizierung auf Speziesebene spielen. Für das Erreichen besserer Identifizierungspotentiale auf Speziesebene müsste die Datenbank daher erweitert oder eigene Referenzbibliotheken erstellt werden (CHERKAOUI et al. 2010; SAUER und KLIEM 2010; BIZZINI et al. 2011). Eine weitere Möglichkeit das Identifizierungspotential der MALDI-TOF MS zu verbessern, ist die Vorbereitung der Proben. BESSÈDE et al. (2011) und BIZZINI et al. (2010) beobachteten in ihren Studien einen Anstieg gut identifizierter Proben um 15% bzw. 23% nach der Aufreinigung der Isolate. In der vorliegenden Arbeit wurden alle Isolate vor der Identifizierung durch die MALDI-TOF MS aufgereinigt (siehe 3.7.1.1), so dass aus dieser Sicht das Möglichste getan wurde, um gute Ergebnisse zu erzielen.

Zudem bereiten grampositive Bakterien häufiger Probleme bei der Identifizierung durch konventionelle Methoden und auch durch MALDI-TOF MS als gramnegative Bakterien (SMOLE et al. 2002; CHERKAOUI et al. 2010; BESSÈDE et al. 2011). Dennoch konnten in

der vorliegenden Studie mit MALDI-TOF MS 79% der 329 Isolate auf Speziesebene und 90% auf Genusebene identifiziert werden, obwohl hier ausschließlich mit grampositiven coryneformen Stäbchen gearbeitet wurde.

Die Sensitivität der MALDI-TOF MS verglichen mit der 16S rDNA-Sequenzierung und dem API Coryne System zeigt, dass mit 86% die MALDI-TOF MS mehr mit dem Identifizierungspotential der 16S rDNA-Sequenzierung als mit dem des API Coryne vergleichbar ist. Die Sensitivität der MALDI-TOF MS verglichen mit dem API Coryne liegt hier nämlich bei geringeren 64%. Folglich ist die MALDI-TOF MS eine besser geeignete Identifizierungsmethode als API Coryne. BENAGLI et al. (2011) vergleichen in ihrer Studie ebenfalls die Sensitivität der MALDI-TOF MS, aber auch biochemischer Verfahren, mit der 16S rDNA-Sequenzierung und erzielen für die MALDI-TOF MS sogar noch höhere Sensitivitäten $\geq 90\%$ für die Identifizierung verschiedener Keime.

Der Vergleich der Identifizierungsergebnisse aller drei Methoden zeigt, dass das identifizierte Artenspektrum mit MALDI-TOF MS mit Isolaten aus 15 verschiedenen Spezies umfangreicher war als das des API Coryne, der unter den 329 Isolaten nur 6 verschiedene Spezies identifizierte. Die Datenbank der MALDI-TOF MS enthält 71 verschiedene *Corynebacterium spp.*. Die Datenbank des API Coryne enthält dagegen nur 20 *Corynebacterium spp.*. Allein die Tatsache dieses großen Unterschiedes an Artenvielfalt in der Datenbank und die Tatsache, dass in der API Coryne Datenbank überwiegend häufig vorkommende Humanpathogene enthalten sind, erklären das umfangreichere Ergebnis verschiedener Spezies durch die MALDI-TOF MS. Des Weiteren lassen diese Ergebnis vermuten, dass die apiweb™ Identifizierungssoftware für die abgelesenen API Codes in der eigenen Studie falsche Ergebnisse geliefert haben muss, da mit der MALDI-TOF MS weitere neun Spezies identifizierbar waren (FUNKE et al. 1997b; KONRAD et al. 2010). Die Falschidentifizierung des API Coryne wird auch durch zwei Spezies, *C. diphtheriae mitis/belfanti* und *C. jeikeium*, deutlich, die ausschließlich biochemisch und nicht mit der 16S rDNA-Sequenzierung oder der MALDI-TOF MS identifiziert wurden. Die sechs in der MALDI-TOF MS Datenbank enthaltenen Referenzspektren von *C. jeikeium* sind laut SENG et al. (2009) ausreichend für eine Identifizierung dieses Keimes. KONRAD et al. (2010) konnten mit ihrer Studie zur Diagnostik potentiell toxischer Corynebakterien zeigen, dass *C. diphtheriae mitis/belfanti* mit der MALDI-TOF MS zumindest als *C. diphtheriae* identifiziert werden kann.

Der signifikante Unterschied des Identifizierungspotential für *C. ammoniagenes* zwischen MALDI-TOF MS und API Coryne ($p=0,0001$) und zwischen 16S rDNA-Sequenzierung und

API Coryne ($p=0,0004$) lässt sich damit erklären, dass dieser Keim gar nicht in der API Coryne Datenbank enthalten ist und somit biochemisch auch gar nicht identifiziert werden konnte (KONRAD et al. 2010). Dasselbe gilt für den signifikanten Unterschied für *Brevibacterium stationis* zwischen MALDI-TOF MS und API Coryne ($p=0,0003$), denn auch dieses coryneforme Bakterium ist nicht in der Datenbank des API Coryne enthalten. Der Unterschied zwischen MALDI-TOF MS und 16S rDNA-Sequenzierung ($p=0,0037$) für *Brevibacterium stationis* könnte daran liegen, dass eine Taxonomieänderung von BERNARD et al. (2010) vorgeschlagen wurde, nach der *Brevibacterium stationis* umbenannt werden sollte in *Corynebacterium stationis* und Zitrat-verwertende *C. ammoniagenes* Stämme ebenfalls zu dieser neuen Spezies gezählt werden sollten. So ist es möglich, dass die 16S rDNA-Sequenzierung einige *Brevibacterium stationis* als *C. ammoniagenes* und die MALDI-TOF MS einige *C. ammoniagenes* als *Brevibacterium stationis* identifiziert hat, da diese Taxonomieänderungen in den Datenbanken noch nicht beachtet wurde. Für *C. confusum* besteht ein signifikanter Unterschied in der Identifizierung zwischen 16S rDNA-Sequenzierung und API Coryne ($p=0,0014$), was auch darauf zurückzuführen ist, dass dieses *Corynebakterium* nicht in der API Coryne Datenbank enthalten ist (KONRAD et al. 2010). Schlussendlich hat die MALDI-TOF MS in dieser Studie das beste Identifizierungspotential aller drei Methoden gezeigt. Überdies ist MALDI-TOF MS im Vergleich zu den beiden anderen Methoden ein schnelles und kostengünstiges Verfahren. Es hat eine höhere Trennschärfe als einige konventionelle Methoden, auch konnte eine bessere Übereinstimmung mit Sequenzierungen beobachtet werden und die meisten Ergebnisse sind einen Tag früher abrufbar als mit bisherigen konventionellen und molekularbiologischen Methoden. Die MALDI-TOF MS besitzt das Potential, den Einsatz biochemischer Nachweisverfahren zu ersetzen und die 16S rDNA-Sequenzierung zu reduzieren (CHERKAOUI et al. 2010; KONRAD et al. 2010; SAUER und KLIEM 2010; VAN VEEN et al. 2010; BESSÈDE et al. 2011; BIZZINI et al. 2011).

5.1.2 Übereinstimmungen zwischen den Methoden auf Speziesebene

5.1.2.1 Vergleich aller drei Methoden

In der vorliegenden Studie konnten insgesamt 47 Isolate mit allen drei Methoden - MALDI-TOF MS, 16S rDNA-Sequenzierung und API Coryne - auf Speziesebene identifiziert werden. 75% ($n=35$) der 47 Isolate stimmten in allen drei Methoden überein. Von den restlichen 25% ($n=12$) konnte bei 23% ($n=11$) das Ergebnis der MALDI-TOF MS durch die 16S rDNA-Sequenzierung bestätigt werden. Auch BENAGLI et al. (2011) und BESSÈDE et al. (2011) beobachten in ihren Studien in den meisten Fällen eine Bestätigung des Ergebnisses der

MALDI-TOF MS durch die 16S rDNA-Sequenzierung, wenn die biochemischen Verfahren verglichen mit der MALDI-TOF MS eine Diskrepanz in den Ergebnissen aufwiesen.

Die Isolate, die in allen drei Methoden übereinstimmten, wurden alle als *C. xerosis* identifiziert. Es ist jedoch zu beachten, dass API Coryne *C. xerosis* aufgrund des Fehlens in der Datenbank offiziell nicht identifizieren kann und diese Ergebnisse nur erzielt wurden, da FUNKE et al. (1996) in ihrer Veröffentlichung über *C. xerosis* und *C. ammoniagenes* die API Codes veröffentlichten (KONRAD et al. 2010).

Bei Isolat Nr. 22201 führten alle drei Methoden vermeintlich zu einer unterschiedlichen Speziesidentifizierung. Beachtet man jedoch die Nomenklaturänderung nach BERNARD et al. (2010) bestätigt auch hier die 16S rDNA-Sequenzierung das MALDI-TOF MS Ergebnis. In dieser Studie wird vorgeschlagen, *Brevibacterium stationis* dem Genus *Corynebacterium* als Zitrat-verwertendes *Corynebacterium stationis* zuzuordnen. Des Weiteren soll *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872 ebenfalls zu der Zitrat-verwertenden Spezies *C. stationis* gezählt werden (BERNARD et al. 2010). Das Isolat Nr. 22201 wurde in der 16S rDNA-Sequenzierung exakt als dieser Stamm, *C. ammoniagenes* ATCC 6872, identifiziert und in der MALDI-TOF MS als *Brevibacterium stationis*. Nach der Nomenklaturänderung von BERNARD et al. (2010) entsprechen beide Ergebnisse dieses Isolates demselben Taxon und folglich bestätigt auch hier die 16S rDNA-Sequenzierung die MALDI-TOF MS. API Coryne identifiziert Isolate Nr. 22201 als *C. accolens*, was mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Falschidentifizierung ist, denn die API Datenbank enthält weder *C. ammoniagenes* noch die genaue Spezies *Brevibacterium stationis*, sondern höchstens *Brevibacterium spp.* (KONRAD et al. 2010).

Ein Grund für die insgesamt geringe Anzahl von 47 auf Speziesebene identifizierten Isolate könnte die Tatsache sein, dass die 16S rDNA-Sequenzierung und API Coryne im Vergleich zur MALDI-TOF MS insgesamt weniger Isolate auf Speziesebene identifizieren konnten. So identifizierte MALDI-TOF MS insgesamt 259 Isolate auf Speziesebene, die 16S rDNA-Sequenzierung nur 146 und API Coryne nur 101 Isolate.

Das Identifizierungspotential aller drei Methoden auf Speziesebene mit Übereinstimmung im Ergebnis liegt bei 74%. Dieses Ergebnis erscheint akzeptabel, wenn man beachtet, dass nur 75% der 47 Isolate übereinstimmen und in anderen Studien jede Methode für sich mindestens $\geq 80\%$ der untersuchten Bakterien auf Speziesebene identifizieren können (FUNKE et al. 1997b; MELLMANN et al. 2008; SENG et al. 2009).

MALDI-TOF MS ist somit im Vergleich zum API Coryne die bessere und im Vergleich zur 16S rDNA-Sequenzierung die schnellere und kostengünstigere Identifizierungsmethode (SENG et al. 2009; VAN VEEN et al. 2010; BENAGLI et al. 2011; BESSÈDE et al. 2011).

5.1.2.2 Vergleich MALDI-TOF MS mit der 16S rDNA-Sequenzierung

Auf Speziesebene konnten 127 Isolate mit beiden Methoden identifiziert werden. In 99% der Isolate bestätigte die 16S rDNA-Sequenzierung das Ergebnis der MALDI-TOF MS. Bei dem Isolat, welches in beiden Methoden vermeintlich unterschiedliche Ergebnisse erzielte, handelt es sich ebenfalls um das Isolat Nr. 22201 (siehe 5.1.2.1) und somit wird letztendlich auch hier die MALDI-TOF MS durch die 16S rDNA-Sequenzierung bestätigt. Man kann also sagen, dass die 16S rDNA-Sequenzierung die MALDI-TOF MS in der vorliegenden Arbeit zu 100% bestätigt.

BIZZINI et al. (2011) konnten in einer direkten Vergleichsstudie von MALDI-TOF MS und 16S rDNA-Sequenzierung eine Übereinstimmung auf Speziesebene für 92,2% erzielen. MELLMANN et al. (2008) wendeten als Referenzmethode ebenfalls die 16S rDNA-Sequenzierung an und bekamen eine Übereinstimmung von 82,5% bei der Identifizierung von Nonfermentern auf Speziesebene dieser beiden Methoden. In einer Studie von CHERKAOUI et al. (2010), in der die 16S rDNA-Sequenzierung als bestätigender Goldstandard zur Identifizierung von Bakterien herangezogen wurde, wenn andere konventionelle Methoden versagt hatten, konnten 75-78,3% der Isolate auf Speziesebene identisch mit MALDI-TOF MS und 16S rDNA-Sequenzierung identifiziert werden.

BENAGLI et al. (2011) konnten in einer ähnlichen Studie wie von CHERKAOUI et al. (2010), in der ebenfalls die 16S rDNA-Sequenzierung als bestätigender Goldstandard zur Identifizierung von Bakterien herangezogen wurde, eine Übereinstimmung auf Speziesebene von 63% zwischen MALDI-TOF MS und 16S rDNA-Sequenzierung erzielen.

Alle diese Werte liegen zwar unter den erzielten 99% der vorliegenden Studie. Dennoch zeigen sie, dass die MALDI-TOF MS ein sehr gutes Identifizierungspotential besitzt, welches durch die 16S rDNA-Sequenzierung bestätigt wird. Für *C. xerosis* unterscheidet sich das Identifizierungspotential von MALDI-TOF MS und 16S rDNA-Sequenzierung signifikant ($p=0,00001$). Grund dafür könnte die Gesamtmenge an auf Speziesebene identifizierter Isolate sein, die bei MALDI-TOF MS um 113 Isolate höher liegt und die 16S rDNA-Sequenzierung im Verhältnis dazu mehr Isolate als *C. xerosis* identifiziert hat als die MALDI-TOF MS. Dies könnte wieder daran liegen, dass die MALDI-TOF MS Datenbank nur ein Referenzspektrum enthält, was sich laut SENG et al. (2009) negativ auf eine schnelle und gute Identifizierung auswirkt.

Die Übereinstimmung im Ergebnis auf Speziesebene liegt für die 127 Isolate bei 99%. Dieses sehr gute Ergebnis, bei der die 16S rDNA-Sequenzierung die Ergebnisse der MALDI-TOF MS bestätigt, zeigt, dass die MALDI-TOF MS geeignet ist für die Identifizierung von Bakterien. Dennoch besteht mit $\kappa=0,138$ nur eine schwache Übereinstimmung für diese beiden Methoden. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass für die Berechnung des Kappa-Wertes alle 329 Isolate und alle von MALDI-TOF MS ($n=259$) und von der 16S rDNA-Sequenzierung ($n=146$) auf Speziesebene identifizierten Isolate herangezogen wurden.

Trotzdem kann aufgrund dieser Ergebnisse und ähnlicher Beobachtungen in anderen Studien überlegt werden, die konventionelle DNA Sequenzierung zu reduzieren und durch die MALDI-TOF MS als einfache, schnelle und kostengünstige Methode im Routinelabor zu substituieren (MELLMANN et al. 2008; CHERKAoui et al. 2010; SAUER und KLIEM 2010; BIZZINI et al. 2011).

5.1.2.3 Vergleich des API Coryne mit der 16S rDNA-Sequenzierung

Von 55 Isolaten, die mit beiden Methoden auf Speziesebene identifiziert werden konnten, stimmen 67% in ihrem Ergebnis überein.

Dies ist ein gutes Ergebnis, denn ADDERSON et al. (2008a) konnten in einem Vergleich von biochemischen Methoden und Sequenzierungsverfahren zur Identifizierung von coryneformen Bakterien nur bei einem einzigen Isolat eine Übereinstimmung auf Speziesebene erkennen. BENAGLI et al. (2011) erzielten bei dem Vergleich der 16S rDNA-Sequenzierung und dem API System mit 17% zwar eine höhere Übereinstimmung, aber dennoch deutlich geringer als in dieser Studie.

Die 37 Isolate der vorliegenden Arbeit, die in beiden Methoden dasselbe Ergebnis erzielten, beschränkten sich nur auf eine Spezies, *C. xerosis*. Alle anderen Ergebnisse ergaben unterschiedlichste *Corynebacterium spp.* und coryneforme Bakterien (siehe Tabelle 27, Anlage 5).

ADDERSON et al. (2008a) begründeten die geringe Übereinstimmung zwischen biochemischen und molekularbiologischen Methoden durch die Notwendigkeit weiterführender Test für viele biochemische Identifizierungskits für die genaue Speziesidentifizierung und das Fehlen von selten vorkommenden Spezies in den entsprechenden Datenbanken. FUNKE et al. (1997b) erwähnen ebenfalls die Notwendigkeit weiterführender Tests für die genaue Identifizierung einiger Spezies und die Abwesenheit relevanter, aber nicht häufig vorkommender Humanpathogene in einer Evaluierung des API Coryne Systems. KONRAD et al. (2010) beobachteten in ihrer Studie ungenaue Ergebnisse

mit dem API Coryne System und begründen dies ebenfalls mit einer lückenhaften Datenbank, die für humanpathogene Keime erstellt wurde (siehe dazu auch Abschnitt 5.1.1).

Die Übereinstimmung im Ergebnis auf Speziesebene liegt bei den beiden Methoden bei 67% und bezieht sich nur auf eine einzige Spezies, *C. xerosis*. Auch mit $\kappa=0,129$ zeichnet sich nur eine schwache Übereinstimmung dieser beiden Methoden ab. Dies war jedoch zu erwarten, da das API Coryne System mit seiner minimierten Datenbank nicht dieselben Möglichkeiten hat wie die 16S rDNA-Sequenzierung. Dies zeigt sich auch darin, dass die als *C. xerosis* identifizierten Stämme die einzigen Identifizierungen auf Speziesebene waren, die in beiden Methoden für dieselben Isolate im Ergebnis übereinstimmten. Zudem scheinen viele Unterschiede in der Identifizierung daran zu liegen, dass die API Coryne Datenbank diese Spezies nicht beinhaltet wie beispielsweise *C. ammoniagenes*, *C. confusum*, *C. xerosis* oder *Brevibacterium stationis* (FUNKE et al. 1997b; KONRAD et al. 2010). In diesem Zusammenhang sei erneut angemerkt, dass *C. xerosis* nur korrekt identifiziert werden konnte, da die passenden API Codes von FUNKE et al. (1996) veröffentlicht wurden.

Anhand des sehr geringen Artenspektrums der übereinstimmenden Ergebnisse, dem Wissen um eine lückenhafte Datenbank und des häufigen Bedarfs weiterführender Tests für die genau Speziesidentifizierung erscheint das API Coryne System nicht geeignet für Studien animaler oder der Umwelt entstammender coryneformer Keime.

5.1.2.4 Vergleich der MALDI-TOF MS mit dem API Coryne

Beide Methoden konnten 86 Isolate auf Speziesebene identifizieren. Davon wiesen 76% identische Ergebnisse auf. Dieses Ergebnis ist im Vergleich zu anderen Studien, die diese beiden Methoden miteinander verglichen haben, gering. SENG et al. (2009) erzielten eine Übereinstimmung biochemischer Methoden mit MALDI-TOF MS für 84,1% auf Speziesebene. VAN VEEN et al. (2010) erzielten Übereinstimmungen von 79,9-82,3%, BIZZINI et al. (2010) von 95,1% und BENAGLI et al. (2011) von 94,7%.

Zu beachten ist, dass in der vorliegenden Studie nur API Coryne als biochemische Methode zum Vergleich mit MALDI-TOF MS, in den anderen genannten Studien jedoch die Ergebnisse mehrerer biochemischer Verfahren, wie beispielsweise API, Vitek, Phoenix, Gram-Färbung und Katalase- bzw. Oxidase-Tests, herangezogen wurden und zusammengefasst als konventionelle biochemische Verfahren im Routinelabor mit der MALDI-TOF MS verglichen wurden.

Ebenfalls erwähnenswert ist, dass die Genauigkeit biochemischer Tests, auch die des API Coryne, abhängig von der vorhandenen Datenbank ist, die das Identifizierungspotential dieser Methoden begrenzt. Dadurch kann es zu falschen Ergebnissen kommen oder es ist gar

keine Identifizierung möglich (ADDERSON et al. 2008a). FUNKE et al. (1997b) erwähnen in ihrer Evaluation des API Coryne auch das eingeschränkte Identifizierungspotential durch die Anwendung des API Coryne Systems allein. Zur eindeutigen Identifizierung seien in 55,1% ihrer Fälle noch weiterführende Untersuchungen durchgeführt worden, was auch ein Grund für die geringe Übereinstimmung von MALDI-TOF MS und API Coryne in der vorliegenden Studie sein könnte.

KONRAD et al. (2010) beobachten in ihrer Studie häufig unklare Ergebnisse mit dem API Coryne System. Sie begründen dies ebenfalls durch die Lücken in der aktuellen apiweb™ Identifizierungssoftware aus der API Coryne Datenbasis (V3.0), die auch in der vorliegenden Studie verwendet wurde. Diese Datenbank beinhaltet API Codes für die meisten klinisch relevanten Humanpathogene, jedoch keine der selten aus klinischen Proben isolierten Spezies wie *C. ammoniagenes*, *C. camporealis*, *C. casei*, *C. confusum* und *C. xerosis* (KONRAD et al. 2010). Wie Tabelle 28 in Anlage 5 der eigenen Studie zeigt, gibt es bei der Identifizierung einiger dieser Spezies, besonders *C. ammoniagenes*, *C. confusum* und *C. xerosis*, Unstimmigkeiten in der Identifizierung durch MALDI-TOF MS und API Coryne. Die hohe Übereinstimmung von *C. xerosis* zwischen MALDI-TOF MS und API Coryne (n=62) konnte nur durch Verwendung des von FUNKE et al. (1996) veröffentlichten API Codes erreicht werden.

Statistisch konnte keine Übereinstimmung zwischen diesen beiden Methoden festgestellt werden ($\kappa=0,065$). Auch wenn von 86 Isolaten 65 auf Speziesebene übereinstimmen, so ist dies auf die Gesamtmenge der Isolate (n=329) mit 19% eine sehr geringe Übereinstimmung.

Das API Coryne System erscheint nicht geeignet für eine Bestimmung der *Corynebacterium*-Flora aus Nasentupferproben von Schweinen, aufgrund der bekannten Lücken in der API Datenbank und der Tatsache, dass speziell in der vorliegenden Arbeit nicht nur relevante humanpathogene Keime zu finden waren, sondern auch tierspezifische, seltener isolierte und in der Umwelt angesiedelte Keime, die durch API Coryne nicht identifizierbar sind.

5.1.3 Identifizierungspotential eines zweistufigen Screeningverfahrens mit MALDI-TOF MS und 16S rDNA-Sequenzierung

Das zweistufige Screeningverfahren soll zeigen, dass für eine Differenzierung der erhaltenen Isolate von Corynebakterien oder coryneformen Bakterien die MALDI-TOF MS ausreichend ist, da in dieser Studie 90% der Isolate auf Genusebene bereits durch diese Methode identifiziert werden konnten. Auch wenn in anderen Studien dieser Prozentsatz sogar bei $\geq 95\%$ lag, ist auch in der vorliegenden Arbeit das Vorkommen der gesuchten Keime bereits

durch die MALDI-TOF MS bewiesen (SENG et al. 2009; VAN VEEN et al. 2010; BESSÈDE et al. 2011). In Kombination mit der 16S rDNA-Sequenzierung konnte für die verbleibenden 33 Isolate, bei denen mit MALDI-TOF MS keine Identifizierung möglich war, eine Identifizierung des Genus erzielt werden.

Somit war es möglich alle Isolate mit Hilfe der Kombination dieser beiden Methoden auf Genusebene als *Corynebacterium sp.* oder coryneformes Bakterium zu erkennen

79% der 329 untersuchten Isolate konnten alleine durch MALDI-TOF MS auf Speziesebene bestimmt werden. Die 16S rDNA-Sequenzierung konnte nur 44% der 329 Isolate auf Speziesebene identifizieren, so dass es 113 Isolate gab für die ausschließlich eine Speziesidentifizierung durch die MALDI-TOF MS vorlag, jedoch keine Überprüfung des Ergebnisses durch die 16S rDNA-Sequenzierung. Auch wenn die 16S rDNA-Sequenzierung als Goldstandard für jegliche Floracharakterisierung und bisher auch immer noch als Goldstandard zur Identifizierung von Corynebakterien angesehen wird, wurde hier für 22 ausgewählte Isolate das *rpoB*-Gen sequenziert (STACKEBRANDT und EBERS 2006; FUNKE 2009; CHERKAOUI et al. 2010). Die Sequenzierung des *rpoB*-Gens ist eine einfache und effiziente Methode zur Identifizierung von Corynebakterien und aufgrund der kleinen Fragmentgröße besser geeignet als die 16S rDNA-Sequenzierung, da die prozentuale Homologie dieses zwischen 434 bis 453 bp großen Fragments verschiedener Spezies geringer ist und so eine genauere Differenzierung erlaubt (KHAMIS et al. 2004; KHAMIS et al. 2005; ADDERSON et al. 2008a; PALACIOS et al. 2010).

Für die ausgewählten Fälle stimmten in der vorliegenden Arbeit Ergebnisse der *rpoB*-Sequenzierung mit Ergebnissen der MALDI-TOF MS überein, sodass die 133 Isolate, die nur mit MALDI-TOF MS auf Speziesebene identifiziert werden konnten, dennoch als richtig angesehen werden können, da die *rpoB*-Sequenzierung die Ergebnisse der MALDI-TOF MS bestätigt. Aufgrund des Zeitaufwandes wurden nur bei diesen ausgewählten Isolaten das *rpoB*-Gen sequenziert und ansonsten die 16S rDNA-Sequenzierung als Bestätigung für die MALDI-TOF MS herangezogen.

Schlussendlich zeigt dieses Screening, dass die MALDI-TOF MS eine geeignete und schnelle Methode zur Identifizierung von Corynebakterien ist. BIZZINI et al. (2010; 2011) konnten ebenfalls in ihren Studien coryneforme Bakterien und Corynebakterien mit MALDI-TOF MS richtig identifizieren, auch sie zogen als Bestätigung dieser Methode die 16S rDNA-Sequenzierung heran. Sie untersuchten mit dieser Methode neben *Corynebacterium spp.* auch andere Bakteriengattungen wie beispielsweise *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Escherichia* und *Enterococcus* mit MALDI-TOF MS in denselben Studien.

KONRAD et al. (2010) sind die ersten, die eine Studie zur Identifizierung ausschließlich von Corynebakterien mit MALDI-TOF MS durchgeführt haben. Auch hier wurde die MALDI-TOF MS als schnellste geeignete Screeningmethode zur Identifizierung von *Corynebacterium spp.* beschrieben.

5.2 Zusammensetzung der nasalen *Corynebacterium*-Flora bei Schweinen

Da sich bei dem Vergleich der drei Methoden - MALDI-TOF MS, 16S rDNA-Sequenzierung und API Coryne - die MALDI-TOF MS als verlässlichste Methode erwies, wurden für die Darstellung der nasalen *Corynebacterium*-Flora ausschließlich MALDI-TOF MS - Ergebnisse zur Interpretation herangezogen.

5.2.1 Unterschiedliche Altersklassen

In der vorliegenden Arbeit waren alle 411 beprobten Tiere *Corynebacterium spp.*-positiv und 68,4% positiv für coryneforme Bakterien. Dabei wurden mit 54% bei den Altsauen am wenigsten und mit 80% bei den Aufzuchtferkeln am meisten coryneforme Keime isoliert. Generell ist bekannt, dass zwischen Altsauen und Ferkeln Infektionsketten bestehen und mit 4-6 Wochen, also gerade in der Anfangszeit als Aufzuchtferkel nach dem Absetzen, eine Immunitätslücke bei den Ferkeln durch das Absinken der maternalen Antikörper entsteht (SIEVERDING 2000; GINDELE 2006).

Es könnte daher sein, dass gerade bei den Aufzuchtferkeln die meisten coryneformen Bakterien nachzuweisen sind, da sie dem Keimdruck noch nicht gewachsen sind und sich folglich mehr Keime in der Nasenflora ansiedeln können. Andererseits sind coryneforme Keime Normalflora des Nasen-Rachenraumes und somit generell in Nasentupferproben zu finden. Warum sie nun vermehrt bei Aufzuchtferkeln zu finden sind, ob dies tatsächlich aufgrund der Immunitätslücke der Fall ist oder eventuell aufgrund der veränderten Haltungsbedingungen nach dem Absetzen, wurde in der Literatur bisher nicht diskutiert. Da Aufzuchtferkel signifikant mehr coryneforme Bakterien aufweisen als Altsauen, verwundert es auch nicht, dass sie ebenfalls signifikant mehr *Brevibacterium stationis*, ein coryneformes Bakterium, als Altsauen aufweisen.

Ein weiterer Keim, der häufig isoliert wurde und ein signifikantes Vorkommen zeigt, ist *C. confusum*. Jedoch ist dieser eher in den Altersklassen Masttiere mit 20% und Jungsauen mit 13% anzutreffen. *C. confusum* scheint demnach vermehrt in den mittleren Altersstufen vorzukommen.

Laut der vorliegenden Arbeit beeinflusst das Alter das Vorkommen von coryneformen Bakterien und *Corynebacterium spp.* in der nasalen Flora von Schweinen. Der Grund dafür

und warum gerade *Brevibacterium stationis* vermehrt aus Proben von Aufzuchtferkeln und *C. confusum* am ehesten aus Proben von Masttieren und Jungsauen zu isolieren war, erscheint noch unklar. Zudem liegt keine Vergleichsliteratur zu diesem Thema vor, so dass weiterführende Untersuchungen zur weiteren Klärung notwendig sind.

5.2.2 Unterschiedliche Betriebsarten

Das allgemeine Vorkommen von *Corynebacterium spp.* und coryneformen Bakterien in der Nasalflora von Schweinen wird durch die Berücksichtigung der unterschiedlichen Betriebsarten - Ferkelerzeugerbetrieb, Mastbetrieb und geschlossenes System - nicht beeinflusst. Jedoch kommen die Keime *C. ammoniagenes* und *C. confusum* mit jeweils 4% signifikant seltener in Ferkelerzeugerbetrieben als in Mastbetrieben und geschlossenen Systemen vor. Eventuell kommen diese Keime eher bei Tieren mit einer Lebendmasse ab 20 Kilogramm vor. Zudem legt das signifikant häufigere Vorkommen von *C. confusum* bei Masttieren (vgl. 4.3.1) nahe, dass die Anwesenheit dieser Keime eher an das Alter der Tiere als an die Betriebsform gekoppelt ist und der signifikante Einfluss der Betriebsarten auf die *Corynebacterium*-Flora bei Schweinen dadurch erklärbar ist, dass in Ferkelerzeugerbetrieben keine Masttiere anzutreffen sind.

5.2.3 Unterschiedliche Regionen

Für das generelle Vorkommen von *Corynebacterium spp.* und coryneformen Bakterien in der Nasenflora von Schweinen sind keine regionalen Besonderheiten zu erkennen. Alle beprobten Betriebe in allen Regionen waren positiv.

Betrachtet man das generelle Vorkommen von coryneformen Bakterien bei den Schweinen, so fällt auf, dass sie am häufigsten in Mittelfranken (84%) und am seltensten in Niederbayern (56%) aus Proben zu isolieren waren. Demzufolge erscheint es auch logisch, dass *Brevibacterium stationis*, ein coryneformes Bakterium, zu 78% aus mittelfränkischen Betrieben zu isolieren war.

Wie das Auftreten von coryneformen Bakterien, speziell *Brevibacterium stationis*, jedoch regional beeinflusst wird, ist unklar und konnte aufgrund fehlender Literatur zu diesem Thema nicht weiter abgeklärt werden. Zudem wurde *Brevibacterium stationis* bisher noch nicht in einschlägiger Literatur wie beispielsweise FUNKE et al. (1997a; 2007) zu klinisch relevanten Pathogenen gezählt, so dass dem regionalen Auftreten keine besondere Bedeutung zukommt.

Prinzipiell ist jedoch zu sagen, dass das allgemeine Vorkommen von *Corynebacterium spp.* und coryneformen Bakterien in den beprobten Betrieben der vorliegenden Studie regional nicht beeinflusst wurde.

5.3 Zusammensetzung der nasalen und tonsillären *Corynebacterium*-Flora bei Schweinen

Der Vergleich dieser beiden Lokalisationen der Probeentnahme zeigte, dass bei allen 17 mittels Nasen- und Tonsillentupfern beprobten Ferkeln *Corynebacterium spp.* gefunden wurden. Coryneforme Bakterien konnten mit 53% zu 24% häufiger aus Nasentupferproben als aus Tonsillentupferproben (29%) isoliert werden. Die drei häufigsten Keime, die aus Proben beider Entnahmestellen isoliert werden konnten, waren auch hier *C. xerosis*, *C. ammoniagenes* und *Brevibacterium stationis*. Weitere sechs isolierte Spezies stimmten in der Lokalisation der Entnahmestelle nicht überein und weder in nasalen noch in tonsillären Proben konnten toxinproduzierende Spezies gefunden werden. Somit ist laut diesem Vergleich für den Nachweis von *Corynebacterium spp.* die Lokalisation der Probennahme nicht relevant, jedoch erscheinen Nasentupferproben zum Nachweis anderer coryneformer Bakterien besser geeignet zu sein.

Eine übliche Methode zur Entnahme von Proben zum Nachweis von Corynebakterien bei Schweinen konnte in der Literatur noch nicht entdeckt werden. DEVRIESE et al. (2000) isolierten beispielsweise *C. glucuronolyticum* aus dem Genitalbereich weiblicher und männlicher Schweine, VELA et al. (2006) *C. xerosis* aus Lungen- und Nierengewebe, aber auch aus Blut unterschiedlich erkrankter Tiere. Coryneforme Bakterien konnten auf Haut und Schleimhäuten physiologisch unauffälliger Schweine ausfindig gemacht werden (SCHNURRBUSCH 2006a; ROLLE und MAYR 2007b). Auch toxinproduzierende *Corynebacterium spp.* wurden laut bisheriger Quellen bei Schweinen aus unterschiedlichen Proben wie Pharyngealtupfern, Lymphknoten und Zervixabstrichen isoliert (ZHAO et al. 1993; SCHUHEGGER et al. 2009; CONTZEN et al. 2011). Da bei anderen Tierarten und auch dem Menschen die gängigste Entnahmetechnik zur Evaluierung von Corynebakterien und verwandter Arten bisher Nasen-, Tonsillen- und Rachenabstriche waren, wurden bei den ersten 17 Ferkeln sowohl Abstriche aus dem Nasenvorhof als auch der Tonsillen entnommen, um zu überprüfen, welche der beiden Methoden bei Schweinen besser geeignet ist und zuverlässigere Ergebnisse liefert (LARTIGUE et al. 2005; HOGG et al. 2009; PODBIELSKI et al. 2010).

Daraus wurde ersichtlich, dass die Beprobung mittels Nasentupfern gegenüber Tonsillenabstrichen Vorteile bezüglich der Umsetzung der Methoden mit sich bringt. Der Tonsillenabstrich bedeutet für die Tiere erhöhten Stress, aufgrund eines nötigen Mundkeiles während der Durchführung der Probennahme. Wogegen ein Nasenabstrich schnell entnommen werden kann und die Tiere dabei lediglich durch einen Helfer entweder auf dem Arm oder mit einer Oberkieferschlinge fixiert werden. Des Weiteren können durch Abwehrbewegungen der Tiere und damit verbundene Berührungen der Maulschleimhaut die Ergebnisse des Tonsillenabstriches verfälscht werden, die Realisierung der Entnahme der Nasentupfer ist hier durch die schnellere Durchführbarkeit wesentlich präziser. Überdies ist das Risiko für den Probennehmer und das beprobte Tier bei Tieren im Mittel- und Endmastbereich sowie Sauen oder Ebern durch Abstriche aus den Nasenvorhöfen wesentlich geringer. Insgesamt stellt die Untersuchung der nasalen *Corynebacterium*-Flora eine einfache und effiziente Methode dar.

5.4 Die nasale *Corynebacterium*-Flora des Schweines

Die zwei vorherrschenden Keime, die bei allen Tieren unabhängig vom Alter, der Betriebsart, der Region und auch der Entnahmetechnik isoliert werden konnten, sind *C. xerosis* und *Brevibacterium stationis*. Der dritthäufigste Keim ist *C. confusum*. Er taucht jedoch nicht beim Vergleich zwischen Nasen- und Tonsillentupferproben auf. Grund hierfür könnte die Anzahl der beprobten Ferkel (n=17) und das generell geringere Vorkommen von *C. confusum* bei Ferkeln von 7% (6 von 82 Ferkeln) sein.

Das Vorkommen vieler Corynebakterien und coryneformer Bakterien ist derzeit noch nicht geklärt. So konnten über *C. confusum* und *Brevibacterium stationis* derzeit noch keine Veröffentlichungen im Zusammenhang mit Schweinen und der eventuellen Zugehörigkeit zur physiologischen Nasenflora gefunden werden. *C. xerosis* konnte bereits mit Schweinen in Verbindung gebracht werden. Die veterinärmedizinische Bedeutung für Schweine, ob der Keim *C. xerosis* nur ein harmloser Kommensale ist oder klinische Relevanz für die Tiere hat, bleibt in bisheriger Vergleichsliteratur unklar. So gelingt VELA et al. (2006) der Nachweis des Erregers aus Gelenken von Schweinen mit Arthritis und Abszessen, mit subkutanen Abszessen, Nierengewebe von Schweinen mit Atemwegsproblemen, Lungengewebe bei Schweinen mit Verdacht auf Rotlauf und auch aus Blut plötzlich verendeter Schweine. In der vorliegenden Studie jedoch wird *C. xerosis* zu 100% aus den Nasenvorhöfen gesunder Tiere isoliert, so dass der Schluss nahe liegt, dass VELA et al. (2006) wohl Kontaminanten nachgewiesen haben. Grund dafür ist, dass *C. xerosis* bisher in der Literatur nicht als

Krankheitserreger beim Schwein beschrieben wurde und zudem alle beprobten Schweine der vorliegenden Arbeit, wie bereits erwähnt, klinisch gesund waren, was nahe legt, dass *C. xerosis* zur Normalflora des Schweines zählt.

5.5 Abhängigkeit der Zusammensetzung der nasalen *Corynebacterium*-Flora bei Schweinen von bestimmten Betriebsparametern

22% der 41 beprobten Betriebe haben einen sehr guten Hygienestatus mit einem Punktwert von neun bis 12 Punkten, 76% einen guten Hygienestatus mit einem Punktwert von fünf bis acht Punkten und nur 2% einen schlechten Hygienestatus mit einem Punktwert von null bis vier Punkten. Dennoch sind in allen Betrieben unabhängig vom Hygienestatus *Corynebacterium spp.* und coryneforme Bakterien zu finden, da sie zur Normalflora gesunder Schweine zählen und daher vermutlich keinen Indikator für eine mangelhafte Hygiene darstellen.

Obwohl es einen Ferkelerzeugerbetrieb gibt, der nur Hygienestatus I aufweisen kann, scheinen die restlichen Betreiber der beprobten Ferkelerzeugerbetriebe mehr Gewicht auf eine gute bis sehr gute Hygiene zu legen. So haben 69% der Ferkelerzeugerbetriebe Hygienestatus II und im Vergleich zu Mastbetrieben mit 23% und geschlossenen Systemen mit 17% haben mit 25% mehr Ferkelerzeuger den Hygienestatus III. Grund hierfür könnte sein, dass die Betriebsangehörigen von Ferkelerzeugerbetrieben den (Re-)Infektionsdruck von den Ferkeln auf die Sauen und umgekehrt reduzieren möchten, um Infektionsketten unterbrechen und Erkrankungshäufigkeiten reduzieren zu können, was sich positiv auf die Vermarktung der Tiere auswirkt. Zudem sind die Anforderungen an das Management im Abferkel-, Ferkelaufzucht- und Deckbereich bedeutend höher als bei konventioneller Produktion, was durch das generelle Hygieneverhalten von Betreibern von Ferkelerzeugerbetrieben sicher einen positiven Einfluss auf den Hygienestatus hat (GINDELE 2006).

Dennoch beeinflussen die in dieser Studie ausgewählten Betriebsparameter die nasale Keimflora von Schweinen und das Vorkommen von *Corynebacterium spp.* und coryneformen Bakterien nicht. Ebenso haben die Hygienestatus keinen signifikanten Einfluss auf das Vorkommen bestimmter Keimarten.

5.6 Zusammensetzung der nasalen *Corynebacterium*-Flora von Betriebsangehörigen schweinehaltender Betriebe

In diesem Teil der Studie wird ersichtlich, dass das Vorkommen von *Corynebacterium spp.* und coryneformen Bakterien bei den Probanden mit dem generellen Vorkommen dieser Keime auf dem Betrieb gekoppelt ist. So sind alle drei Betriebsformen - Ferkelerzeugerbetriebe, Mastbetriebe und geschlossene Systeme - positiv für *Corynebacterium spp.* und coryneforme Bakterien und von den 30 beprobten Personen der insgesamt 41 Betriebe sind 97% *Corynebacterium*-positiv und 23% coryneforme Bakterien-positiv.

Dass in der physiologischen Nasenflora des Menschen *Corynebacterium spp.* und andere coryneforme Bakterien angesiedelt sind, ist durchaus bekannt (FUNKE et al. 1997a; MIMS et al. 2006; FUNKE und BERNARD 2007). Jedoch kann in sehr vielen Studien nicht festgestellt werden, ob die Keime generell an den beprobten Stellen zu finden sind oder nur in Verbindung mit Erkrankungen, da die klinischen Proben aufgrund pathologischer Auffälligkeiten genommen werden und nicht um die physiologische Flora zu bestimmen. VON GRAEVENITZ et al. (1998) konnten beispielsweise *C. amycolatum* und *C. striatum* nicht aus Rachenabstrichen gesunder Personen isolieren, obwohl sie Teil der normalen Hautflora des Menschen sind (FUNKE und BERNARD 2007). Grund hierfür ist, dass die Rachenschleimhaut und die Haut unterschiedliche Habitate für Keime sind und die Lebensweise der Menschen eine geringere Übertragung von der Haut auf die Schleimhäute begünstigt, anders wie zum Beispiel bei Hunden und Katzen, für die die Schleimhaut überzogene Zunge als Reinigungsorgan dient. Andererseits beschreiben beispielsweise DALAL et al. (2008) eine durch *C. amycolatum* verursachte Endokarditis mit sonographisch und auskultatorisch darstellbaren Veränderungen an den Mitralklappen, was verdeutlicht dass dieser Keim zumindest fakultativ pathogen sein muss.

Es ist anzunehmen, dass die Betriebsangehörigen schweinehaltender Betriebe und andere Personen mit Kontakt zu Schweine wie beispielsweise Schlachthofmitarbeiter und Tierärzte eine größere und eventuell auch eine vielfältigere Keimflora in ihren Nasen haben als Menschen ohne Umgang mit Schweinen. Diese Vermutung wird alleine schon dadurch bestärkt, dass die humane Flora der porcinen in der vorliegenden Arbeit sehr stark ähnelt und den Schluss nahe legt, dass es sich hier auch um Isolate porcinen Ursprungs handelt. So waren die drei am häufigsten aus Nasentupferproben von Betriebsangehörigen schweinehaltender Betriebe isolierten Keime *Corynebacterium xerosis* (87%), *Corynebacterium confusum* (23%) und *Brevibacterium stationis* (23%). Diese drei Keime konnten auch am häufigsten aus den

porcinen Proben isoliert werden, so dass zudem davon auszugehen ist, dass der tägliche Umgang mit den Tieren und das Arbeiten in den Stallungen zum Vorkommen derselben *Corynebacterium*-Flora und verwandter Arten bei Betriebsangehörigen führt wie sie bei den eigenen Tieren zu finden ist.

Corynebakterien und coryneforme Bakterien sind Teil der natürlichen Flora auf Haut und Schleimhäuten des Menschen, ob diese drei Spezies jedoch Bestandteil der physiologischen humanen Nasenflora sind, ist aus der bisherigen Literatur nicht ersichtlicht. *C. xerosis* wird als Kommensale der menschlichen Haut und Schleimhäute erachtet, der nur selten für Menschen pathogen ist (FUNKE et al. 1996; VELA et al. 2006; PALACIOS et al. 2010). *C. confusum* wurde bisher eher aus Proben von Patienten mit Fußinfektionen oder Brustabszessen isoliert und nicht aus nasalen Proben (FUNKE und BERNARD 2007). *Brevibacterium stationis* ist wie alle *Brevibacterium* spp. Teil der Normalflora der menschlichen Haut, scheint bisher für den Menschen aber keine klinische Relevanz zu haben (FUNKE et al. 1997a; FUNKE und BERNARD 2007). Dies zeigt, dass beim Umgang mit Schweinen eine mögliche Infektionsgefahr mit fakultativ pathogenen *Corynebacterium* spp. für Menschen bestehen kann. Zumal in der vorliegenden Studie nicht nur *C. xerosis* und *C. confusum* isoliert wurden, die in der Literatur bereits mit Erkrankungen des Menschen assoziiert wurden, sondern auch *C. amycolatum*, das bereits aus Endokarditiden und Wundinfektionen isoliert werden konnte. *C. accolens*, das in Proben von Augen, Ohren, des Nasopharynx und von Endokarditiden gefunden werden konnte, und auch *C. pseudodiphtheriticum*, das bereits Pneumonie bei Menschen verursacht hat (FUNKE und BERNARD 2007; DALAL et al. (2008); OLENDER und LETOWSKA (2010)).

5.7 Vorkommen toxinproduzierender *Corynebacterium* spp.

In der eigenen Studie konnten weder aus den 411 porcinen noch aus den 30 humanen Proben, toxinproduzierende Corynebakterien wie *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* und *C. pseudotuberculosis* isoliert werden. Zu dem gleichen Ergebnis gelangten auch BERGER et al. (2009) bei einer Untersuchung von 69 Nasentupferproben asymptomatischer Schweine, obwohl bereits auch einige wenige Fälle bekannt sind, in denen sowohl asymptomatische als auch an Lymphadenitis erkrankte Schweine als Träger von toxinproduzierenden *Corynebacterium* spp. bekannt sind (ZHAO et al. 1993; SCHUHEGGER et al. 2009; CONTZEN et al. 2011).

Auch das Bestandsscreening aufgrund eines Ausbruchsgeschehens in einem landwirtschaftlichen Betrieb konnte die Annahme von SCHUHEGGER et al. (2009), dass

Schweine eine mögliche Quelle für toxische *C. ulcerans* Stämme sind, nicht bestätigen. Aufgrund der aus der Literatur belegten Fähigkeit aller drei Methoden – MALDI-TOF MS, 16S rDNA-Sequenzierung und API Coryne – toxinproduzierende *Corynebacterium spp.* eindeutig bestimmen zu können, kann die Vermutung falsch negativer Ergebnisse ausgeschlossen werden (PASCUAL et al. 1995; FUNKE et al. 1997b; FUNKE und BERNARD 2007; FUNKE 2009; CHERKAOUI et al. 2010; KONRAD et al. 2010).

Bei den vier *Corynebacterium diphtheriae mitis/belfanti* Stämmen, die der API Coryne identifiziert hat, handelt es sich um falsch positive Ergebnisse. Von diesem Phänomen berichten bereits FUNKE et al. (1997b) in ihrer Evaluierung des API Coryne Systems. Zusätzlich beobachten sie in ihrer Studie, dass 18 von 24 *C. diphtheriae* Isolaten zusätzliche Test zur richtigen Identifizierung benötigten, so dass dies für die vorliegende Studie bedeuten könnte, dass erst durch weiterführende Untersuchungen die Bestätigung oder Widerlegung für diese vier *C. diphtheriae mitis/belfanti* Ergebnisse benötigt worden wäre (FUNKE et al. 1997b). Ein weiterer Grund dafür, dass diese Ergebnisse falsch positiv sind, könnte die Bebrütungsdauer von 24 bis 48h laut Herstellerangaben sein. FUNKE et al. (1997b) beobachteten in ihrer Studie nämlich auch Corynebakterien, die erst nach mehr als 24h Säuren aus Kohlehydraten bilden und eine Inkubation von nur 24h nicht ausreichen könnte für eine richtige Identifizierung. Da alle API Coryne in der vorliegenden Studie nach einer Bebrütungsdauer von 24 Stunden ausgewertet wurden, kann auch die Inkubationszeit ein Grund für diese vier Ergebnisse sein.

Grundsätzlich kann aus den vorliegenden Ergebnissen und der ausgewerteten Literatur geschlossen werden, dass das Schwein kein primäres Reservoir für toxinproduzierende *Corynebacterium spp.* ist und nur in Ausnahmefällen eine Infektion mit diesen Keimen entwickelt. Das Schwein ist als Infektionsquelle für den Menschen daher von untergeordneter Bedeutung.

6 Schlussfolgerung

6.1 Vergleich der drei Methoden MALDI-TOF MS, 16S rDNA-Sequenzierung und API Coryne

Die Ergebnisse bezüglich des Methodenvergleichs in dieser Studie zeigen, dass API Coryne nicht geeignet ist für die Bestimmung der *Corynebacterium*-Flora von Schweinen, da die API Datenbank ihren Schwerpunkt auf Humanpathogene legt und durch die begrenzte Menge von 20 *Corynebacterium spp.* in der API Datenbank eine korrekte Speziesidentifizierung animaler oder der Umwelt entstammender *Corynebacterium spp.* oder coryneformer Bakterien häufig nicht möglich ist. Zudem kann frühestens, ausgehend von Isolaten, die in Reinkulturen vorliegen, nach 24 Stunden ein Ergebnis erzielt werden, was bei den Mengen einer solchen florabestimmenden Studie sehr zeitaufwendig ist. Letztendlich hat das API Coryne System nur 31% der 329 Isolate, die für den Methodenvergleich herangezogen wurden, auf Speziesebene identifizieren können und bestätigte nur in 65 von 86 Fällen (76%) das Ergebnis auf Speziesebene des MALDI-TOF MS.

Die 16S rDNA-Sequenzierung hingegen wird heute immer noch als Goldstandard für die Bestimmung unbekannter Keime und für Florabestimmungen herangezogen. Auch bestätigt sie in 126 von 127 Fällen (99%) das Ergebnis auf Speziesebene des MALDI-TOF MS und konnte insgesamt bereits 44% der 329 Isolate auf Speziesebene identifizieren. Dennoch wurde die 16S rDNA-Sequenzierung in dieser Arbeit nur als Bestätigung der MALDI-TOF MS und nicht als Standardmethode verwendet, da hier frühestens nach 48 Stunden Isolate spezifiziert werden können und dieses Verfahren insgesamt sehr kostspielig ist.

Gegenüber den beiden erst genannten Methoden erscheint MALDI-TOF MS in dieser Studie die geeignetste Methode zu sein. Sie ist schnell, kostengünstig und einfach durchzuführen, man erzielt innerhalb 15 Minuten die Identifizierung eines Isolates und kann 96 Isolate gleichzeitig identifizieren. Zusätzlich erzielte die MALDI-TOF MS mit 79% die meisten Speziesidentifizierungen, so dass es sinnvoll war diese Methode zur Bestimmung der nasalen *Corynebacterium*-Flora des Schweines in dieser Arbeit heranzuziehen.

Für zukünftige Studien dieser Art wäre zu überlegen, die MALDI-TOF MS Datenbank zu erweitern und zu ergänzen. Denn auch hier liegt bisher der Hauptschwerpunkt auf humanpathogenen Corynebakterien. Eine Erweiterung mit Corynebakterien der Umweltflora und tierspezifischen Keimen würde sicher noch genauere Florastudien ermöglichen. Zusätzlich dazu könnte eine ergänzende Bestimmung nicht identifizierbarer Isolate durch die

Sequenzierung des *rpoB*-Gens erfolgen, da diese speziell für Corynebakterien entwickelte Sequenzierung noch genauere Ergebnisse als die 16S rDNA-Sequenzierung liefern kann.

6.2 *Corynebacterium*-Flora der Schweine und Betriebsangehöriger schweinehaltender Betriebe

Die vorliegende Arbeit ist die erste, ausführliche Studie über die nasale *Corynebacterium*-Flora des Schweines und Betriebsangehöriger schweinehaltender Betriebe.

Alle 41 Betriebe waren zum Zeitpunkt der Beprobung *Corynebacterium*- und coryneforme Bakterien-positiv. Von den 411 mittels Nasentupfer beprobten Tieren waren alle *Corynebacterium*-positiv und 68,4% auch positiv für coryneforme Bakterien. Ebenso waren von den 30 beprobten Betriebsangehörigen 97% *Corynebacterium*-positiv und 23% positiv für coryneforme Bakterien. Die am häufigsten zu findenden Keime waren sowohl in den porcinen als auch in den humanen Proben *C. xerosis*, *Brevibacterium stationis* und *C. confusum*. Diese Ergebnisse zeigen, dass Corynebakterien generell sehr zahlreich in der Nasenflora von Schweinen zu finden sind und der Umgang mit diesen Tieren dazu führt, dass Betriebsangehörige schweinehaltender Betriebe eine ähnliche Nasenflora wie ihre Tiere aufweisen. Aufgrund dieser Erkenntnisse, sollte man nicht außer Acht lassen, dass beim Umgang mit Schweinen immer auch eine mögliche Infektionsgefahr mit (fakultativ) pathogenen Corynebakterien, wie zum Beispiel *C. accolens*, *C. amycolatum*, *C. confusum*, *C. pseudodiphtheriticum* und *C. xerosis*, für Menschen bestehen kann.

6.3 Toxinproduzierende *Corynebacterium* spp.

Es wurden weder bei den Schweinen noch bei den beprobten Landwirten toxigene *Corynebacterium* spp. gefunden, obwohl SCHUHEGGER et al. (2009) bereits von einem Fall berichten, bei dem toxinogene *C. ulcerans* sowohl bei einer erkrankten Landwirtin als auch bei Schweinen des Betriebs nachgewiesen wurden. CONTZEN et al. (2011) beschreiben auch Lymphadenitiden bei Wildschweinen verursacht durch *C. ulcerans*. Grundsätzlich kann aus den vorliegenden Ergebnissen und der ausgewerteten Literatur geschlossen werden, dass das Schwein kein primäres Reservoir für toxinproduzierende *Corynebacterium* spp. ist und nur in Ausnahmefällen eine Infektion mit diesen Keimen entwickelt. Das Schwein ist als Infektionsquelle für den Menschen daher von untergeordneter Bedeutung. Dennoch sollten beim Umgang mit Schweinen zumindest einfache Hygienemaßnahmen wie das Tragen von Schutzkleidung und das Waschen der Hände nach Tierkontakt und beendeter Stallarbeit nicht vernachlässigt werden.

7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde die nasale *Corynebacterium*-Flora des Schweines unter besonderer Berücksichtigung von toxinproduzierenden Spezies in bayerischen Schweinebeständen sowie die nasale *Corynebacterium*-Flora der Landwirte der jeweiligen Betriebe untersucht. Die 41 beprobten Betriebe verteilten sich über die Regierungsbezirke Oberbayern, Niederbayern, Schwaben, Oberpfalz und Mittelfranken und beinhalteten 16 Ferkelerzeugerbetriebe, 13 Mastbetriebe und 12 geschlossene Systeme. Insgesamt wurden von 411 Schweinen unterschiedlicher Altersstufen Nasenschleimhautabstriche genommen.

Die ersten 329 Isolate wurden mittels MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry) charakterisiert und die Ergebnisse mit denen von API Coryne und 16S rDNA-Sequenzierung verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass MALDI-TOF MS 79% dieser Isolate auf Speziesebene identifizieren konnte, die 16S rDNA-Sequenzierung 44% und API Coryne nur 31%. Zudem bestätigte die 16S rDNA-Sequenzierung die MALDI-TOF MS in 126 von 127 Fällen (99%) auf Speziesebene und der API Coryne in nur 65 von 86 Fällen (76%), so dass die MALDI-TOF MS als geeignetste Methode zur Floracharakterisierung in dieser Studie erachtet wurde. Da die MALDI-TOF MS eine schnelle, einfache und kostengünstige Methode ist, die im Vergleich zu den beiden anderen Methoden - 16S rDNA-Sequenzierung und API Coryne - eine Speziesidentifizierung eines Isolates innerhalb von 15 Minuten erlaubt, wurde die MALDI-TOF MS als einziges Identifizierungsverfahren für die restlichen Isolate dieser Studie verwendet.

Die 41 Betriebe waren zu 100% *Corynebacterium*- und coryneforme Bakterien-positiv. Von den 411 beprobten Tieren waren alle *Corynebacterium*-positiv und 68,4% coryneforme Bakterien-positiv. In 27 Betrieben erklärten sich zudem insgesamt 30 Landwirte bereit, sich selbst Nasenschleimhautabstriche zu entnehmen. Davon waren 97% *Corynebacterium*-positiv und 23% coryneforme Bakterien-positiv.

Insgesamt wurden 15 verschiedene *Corynebacterium spp.* und coryneforme Bakterien isoliert, wobei *Corynebacterium xerosis*, *Corynebacterium confusum* und *Brevibacterium stationis* sowohl bei den Schweinen als auch bei den Menschen die am häufigsten zu isolierenden Keime waren. Toxinproduzierende *Corynebacterium spp.* wurden weder bei Schweinen noch bei Menschen nachgewiesen.

Zusätzlich zu den 41 Betrieben wurde ein weiterer landwirtschaftlicher Betrieb aufgrund eines Ausbruchsgeschehen von *Corynebacterium ulcerans* beprobt, um die Rolle dieses Erregers zu evaluieren. Auch hier konnten weder bei sechs beprobten Personen, noch bei einer Katze und

83 Schweinen toxinproduzierende *Corynebacterium spp.* gefunden werden, obwohl alle humanen und tierischen Probanden Kontakt mit dem Landwirt hatten, der mit einem Toxin-positiven *Corynebacterium ulcerans* Stamm infiziert war.

8 Summary

In the present study the nasal *Corynebacterium* flora of swine including toxigenic species in Bavarian swine farms and the nasal *Corynebacterium* flora amongst the swine farmers themselves were examined. Forty-one farms were included in this study: 16 farrowing, 13 finishing and 12 growing-finishing farms. These farms represented five of seven Bavarian administrative districts: Oberbayern, Niederbayern, Schwaben, Oberpfalz and Mittelfranken. Nasal swabs of 411 pigs of varying ages were taken.

The early 329 specimens were determined by MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry) compared to conventional biochemical test system API Coryne and 16S ribosomal DNA sequence analysis. 79% of these 329 isolates were identified at species level by MALDI-TOF MS, 44% by 16S ribosomal DNA sequence analysis and 31% by API Coryne. For 99% (126/127) of the isolates MALDI-TOF MS results were identical with those obtained with 16S ribosomal DNA sequence analysis at the species level. API Coryne confirmed MALDI-TOF MS identification at the species level in only 76% (65/86) of the results. MALDI-TOF MS represents a rapid, easy and cost-efficient identification technique, allowing species identification of an isolate within 15 minutes by testing 96 isolates at the same time. So MALDI-TOF MS was chosen the single method to identify the remaining specimen in the present study.

100% of the 41 agricultural holdings were positive for *Corynebacterium spp.* and coryneforms. All of the 411 sampled pigs were positive for *Corynebacterium spp.* and 68,4% for coryneforms also. 30 swine farmers of 27 farms agreed to examine nasal swabs of themselves. 97% of these were positive for *Corynebacterium spp.* and 23% for coryneforms.

Over all 15 different *Corynebacterium spp.* and coryneforms were detected, whereas *Corynebacterium xerosis*, *Corynebacterium confusum* and *Brevibacterium stationis* could be frequently isolated from both pigs and farmers. In the whole study toxigenic *Corynebacterium spp.* could not be found.

Further, to evaluate the part of *Corynebacterium ulcerans*, specimen of another agricultural holding were taken, because of an onset. Neither the six sampled persons, nor the cat, nor 83 pigs were positive for potentially toxigenic *Corynebacterium spp.*, even though all humans and animals had had contact with the *Corynebacterium ulcerans* infected swine farmer.

Literaturverzeichnis

Adderson, E. E., J. W. Boudreaux, J. R. Cummings, S. Pounds, D. A. Wilson, G. W. Procop und R. T. Hayden (2008a):

Identification of clinical coryneform bacterial isolates: comparison of biochemical methods and sequence analysis of 16S rRNA and rpoB genes.
J Clin Microbiol 46(3): 921-927.

Adderson, E. E., J. W. Boudreaux und R. T. Hayden (2008b):

Infections caused by coryneform bacteria in pediatric oncology patients.
Pediatr Infect Dis J 27(2): 136-141.

Almanjd, P. und G. Bilkei (2008):

Evaluation of pyelonephritis in culled indoor and outdoor high parity sows.
Dtsch Tierarztl Wochenschr 115(1): 34-37.

Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller und D. J. Lipman (1997):

Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.
Nucleic Acids Res 25(17): 3389-3402.

Aubel, D., F. N. Renaud und J. Freney (1997):

Genomic Diversity of Several *Corynebacterium* Species Identified by Amplification of the 16S-23S rRNA Gene Spacer Region.
International Journal of Systematic Bacteriology 47(3): 767-772.

Barbuddhe, S. B., T. Maier, G. Schwarz, M. Kostrzewa, H. Hof, E. Domann, T. Chakraborty und T. Hain (2008):

Rapid identification and typing of listeria species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry.
Appl Environ Microbiol 74(17): 5402-5407.

Benagli, C., V. Rossi, M. Dolina, M. Tonolla und O. Petrini (2011):

Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of clinically relevant bacteria.
PLoS One 6(1): e16424.

Berger, A., I. Huber, S. S. Merbecks, I. Ehrhard, R. Konrad, S. Hörmansdorfer, M. Hogardt und A. Sing (2011):

Toxigenic *Corynebacterium ulcerans* in Woman and Cat.
Emerg Infect Dis 17(9): 1767-1769.

Berger, A., R. Konrad, A. Luze, V. Boschert, K. Heinritzi, S. Hörmansdorfer und A. Sing (2009):

Are pigs a possible reservoir for human *Corynebacterium ulcerans* infections? Identification of *Corynebacterium* strains from porcine nasal swabs.

Poster des bayerischen Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit

Bernard, K. (2005):

Corynebacterium species and coryneforms: an Update on taxonomy and diseases attributed to these taxa.

Clinical Microbiology Newsletter 27(2): 9-18.

Bernard, K. A., M. Bellefeuille und E. P. Ewan (1991):

Cellular fatty acid composition as an adjunct to the identification of asporogenous, aerobic gram-positive rods.

J Clin Microbiol 29(1): 83-89.

Bernard, K. A., D. Wiebe, T. Burdz, A. Reimer, B. Ng, C. Singh, S. Schindle und A. L. Pacheco (2010):

Assignment of *Brevibacterium stationis* (ZoBell and Upham 1944) Breed 1953 to the genus *Corynebacterium*, as *Corynebacterium stationis* comb. nov., and emended description of the genus *Corynebacterium* to include isolates that can alkalize citrate.

Int J Syst Evol Microbiol 60(4): 874-879.

Bessède, E., M. Angla-gre, Y. Delagarde, S. Sep Hieng, A. Ménard und F. Mégraud (2011):

Matrix-assisted laser-desorption/ionization BIOTYPER: experience in the routine of a University hospital.

Clin Microbiol Infect 17(4): 533–538.

Bizzini, A., C. Durussel, J. Bille, G. Greub und G. Prod'hom (2010):

Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory.

J Clin Microbiol 48(5): 1549-1554.

Bizzini, A., K. Jaton, D. Romo, J. Bille, G. Prod'hom und G. Greub (2011):

Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry as an Alternative to 16S rRNA Gene Sequencing for Identification of Difficult-To-Identify Bacterial Strains.

J Clin Microbiol 49(2): 693-696.

Brazzola, P., R. Zbinden, C. Rudin, U. B. Schaad und U. Heininger (2000):

Brevibacterium casei sepsis in an 18-year-old female with AIDS.

J Clin Microbiol 38(9): 3513-3514.

Brown, J. M., R. P. Frazier, R. E. Morey, A. G. Steigerwalt, G. J. Pellegrini, M. I. Daneshvar, D. G. Hollis und M. M. McNeil (2005):

Phenotypic and genetic characterization of clinical isolates of CDC coryneform group A-3: proposal of a new species of *Cellulomonas*, *Cellulomonas denverensis* sp. nov.
J Clin Microbiol 43(4): 1732-1737.

Buck, G. A., R. E. Cross, T. P. Wong, J. Loera und N. Groman (1985):

DNA relationships among some tox-bearing corynebacteriophages.
Infect Immun 49(3): 679-684.

Cannon, J. P., S. L. Spandoni, S. Pesh-Iman und S. Johnson (2005):

Pericardial infection caused by *Brevibacterium casei*.
Clin Microbiol Infect 11(2): 164-165.

Carlotti, A. und G. Funke (1994):

Rapid distinction of *Brevibacterium* species by restriction analysis of rDNA generated by polymerase chain reaction.
Systematic and applied microbiology 17(3): 380-386.

Cassiday, P. K., L. C. Pawloski, T. Tiwari, G. N. Sanden und P. P. Wilkins (2008):

Analysis of toxigenic *Corynebacterium ulcerans* strains revealing potential for false-negative real-time PCR results.
J Clin Microbiol 46(1): 331-333.

Cherkaoui, A., J. Hibbs, S. Emonet, M. Tangomo, M. Girard, P. Francois und J. Schrenzel (2010):

Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level.
J Clin Microbiol 48(4): 1169-1175.

Christensen, R. V., B. Aalbaek und H. E. Jensen (2007):

Pathology of udder lesions in sows.
J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med 54(9): 491-493.

Contzen, M., R. Sting, B. Blazey und J. Rau (2011):

Corynebacterium ulcerans from Diseased Wild Boars.
Zoonoses and Public Health: 1-10.

Coyle, M. B. und B. A. Lipsky (1990):

Coryneform bacteria in infectious diseases: clinical and laboratory aspects.
Clin Microbiol Rev 3(3): 227-246.

Cuevas, W. A. und J. G. Songer (1993):

Arcanobacterium haemolyticum phospholipase D is genetically and functionally similar to Corynebacterium pseudotuberculosis phospholipase D.
Infect Immun 61(10): 4310-4316.

Dalal, A., C. Urban und S. Segal-Maurer (2008):

Endocarditis due to Corynebacterium amycolatum.
J Med Microbiol 57(10): 1299-1302.

Dauga, C., I. Miras und P. A. Grimont (1997):

Strategy for detection and identification of bacteria based on 16S rRNA genes in suspected cases of Whipple's disease.
J Med Microbiol 46(4): 340-347.

De Briel, D., F. Couderc, P. Riegel, F. Jehl und R. Minck (1992):

High-performance liquid chromatography of corynomycolic acids as a tool in identification of Corynebacterium species and related organisms.
J Clin Microbiol 30(6): 1407-1417.

De Zoysa, A., P. M. Hawkey, K. Engler, R. George, G. Mann, W. Reilly, D. Taylor und A. Efstratiou (2005):

Characterization of Toxigenic *Corynebacterium ulcerans* Strains Isolated from Humans and Domestic Cats in the United Kingdom.
J Clin Microbiol 43(9): 4377-4381.

Devriese, L. A., P. Riegel, J. Hommez, M. Vaneechoutte, T. de Baere und F. Haesebrouck (2000):

Identification of Corynebacterium glucuronolyticum strains from the urogenital tract of humans and pigs.
J Clin Microbiol 38(12): 4657-4659.

Dias, A. A., F. C. Silva, Jr., G. A. Pereira, M. C. Souza, T. C. Camello, J. A. Damasceno, L. G. Pacheco, A. Miyoshi, V. A. Azevedo, R. Hirata, Jr., M. H. Boas und A. L. Mattos-Guaraldi (2010):

Corynebacterium ulcerans isolated from an asymptomatic dog kept in an animal shelter in the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil.
Vector Borne Zoonotic Dis 10(8): 743-748.

Dorella, F. A., L. G. Pacheco, S. C. Oliveira, A. Miyoshi und V. Azevedo (2006):

Corynebacterium pseudotuberculosis: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence.
Vet Res 37(2): 201-218.

Efstratiou, A., K. H. Engler, C. S. Dawes und D. Sesardic (1998):

Comparison of phenotypic and genotypic methods for detection of diphtheria toxin among isolates of pathogenic corynebacteria.

J Clin Microbiol 36(11): 3173-3177.

Efstratiou, A., K. H. Engler, I. K. Mazurova, T. Glushkevich, J. Vuopio-Varkila und T. Popovic (2000):

Current approaches to the laboratory diagnosis of diphtheria.

J Infect Dis 181 Suppl 1: S138-145.

Efstratiou, A. und R. C. George (1999):

Laboratory guidelines for the diagnosis of infections caused by *Corynebacterium diphtheriae* and *C. ulcerans*. World Health Organization.

Commun Dis Public Health 2(4): 250-257.

Egen, N. B., W. A. Cuevas, P. J. McNamara, D. W. Sammons, R. Humphreys und J. G. Songer (1989):

Purification of the phospholipase D of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by recycling isoelectric focusing.

Am J Vet Res 50(8): 1319-1322.

Engler, K. H., T. Glushkevich, I. K. Mazurova, R. C. George und A. Efstratiou (1997):

A modified Elek test for detection of toxigenic corynebacteria in the diagnostic laboratory.

J Clin Microbiol 35(2): 495-498.

Fanous, A., W. Weiss, A. Gorg, F. Jacob und H. Parlar (2008):

A proteome analysis of the cadmium and mercury response in *Corynebacterium glutamicum*.

Proteomics 8(23-24): 4976-4986.

Freney, J., M. T. Duperron, C. Courtier, W. Hansen, F. Allard, J. M. Boeufgras, D. Monget und J. Fleurette (1991):

Evaluation of API Coryne in comparison with conventional methods for identifying coryneform bacteria.

J Clin Microbiol 29(1): 38-41.

Funke, G. (2009):

Grampositive aerobe und fakultativ anaerobe Stäbchen.

In: B. Neumeister, H. K. Geiss, R.W. Braun, P. Kimmig (Hrsg.)

Mikrobiologische Diagnostik

Thieme Verlag, Stuttgart 2. Auflage: 352-362.

Funke, G. und K. A. Bernard (2007):

Coryneform Gram-Positiv Rods.

In: P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry, M. A. Pfaller (Hrsg)

Manuel of Clinical Microbiology

ASM Press, Washington, USA 9. Auflage: 485-514.

Funke, G., K. A. Bernard, C. Bucher, G. E. Pfyffer und M. D. Collins (1995a):

Corynebacterium glucuronolyticum sp. nov. isolated from male patients with genitourinary tract infections.

Med. Microbiol. 4: 204-215.

Funke, G., P. A. Lawson, K. A. Bernard und M. D. Collins (1996):

Most *Corynebacterium xerosis* strains identified in the routine clinical laboratory correspond to *Corynebacterium amycolatum*.

J Clin Microbiol 34(5): 1124-1128.

Funke, G., M. Pagano-Niederer und W. Bernauer (1998):

Corynebacterium macginleyi has to date been isolated exclusively from conjunctival swabs.

J Clin Microbiol 36(12): 3670-3673.

Funke, G., C. P. Ramos und M. D. Collins (1995b):

Identification of some clinical strains of CDC coryneform group A-3 and A-4 bacteria as *Cellulomonas* species and proposal of *Cellulomonas hominis* sp. nov. for some group A-3 strains.

J Clin Microbiol 33(8): 2091-2097.

Funke, G., F. N. Renaud, J. Freney und P. Riegel (1997b):

Multicenter evaluation of the updated and extended API (RAPID) Coryne database 2.0.

J Clin Microbiol 35(12): 3122-3126.

Funke, G., A. von Graevenitz, J. E. Clarridge, 3rd und K. A. Bernard (1997a):

Clinical microbiology of coryneform bacteria.

Clin Microbiol Rev 10(1): 125-159.

Gindele, H. R. (2006):

Tierärztliche Bestandsbetreuung.

In: K. Heinritzi, H. R. Gindele, G. Reiner, U. Schnurrbusch (Hrsg.)

Schweinekrankheiten

Eugen Ulmer KG, Stuttgart 1. Auflage: 353-387.

Groman, N., J. Schiller und J. Russell (1984):

Corynebacterium ulcerans and Corynebacterium pseudotuberculosis responses to DNA probes derived from corynephage beta and Corynebacterium diphtheriae.
Infect Immun 45(2): 511-517.

Hauser, D., M. R. Popoff, M. Kiredjian, P. Boquet und F. Bimet (1993):

Polymerase chain reaction assay for diagnosis of potentially toxinogenic Corynebacterium diphtheriae strains: correlation with ADP-ribosylation activity assay.
J Clin Microbiol 31(10): 2720-2723.

Heinritzi, K. (2006a):

Gliedmaßen- und Skeletterkrankungen.

In: K. Heinritzi, H. R. Gindele, G. Reiner, U. Schnurrbusch (Hrsg.)

Schweinekrankheiten

Eugen Ulmer KG, Stuttgart 1. Auflage: 74-88.

Heinritzi, K. (2006b):

Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems.

In: K. Heinritzi, H. R. Gindele, G. Reiner, U. Schnurrbusch (Hrsg.)

Schweinekrankheiten

Eugen Ulmer KG, Stuttgart 1. Auflage: 89-92.

Heinritzi, K. (2006c):

Bakterielle Infektionskrankheiten.

In: K. Heinritzi, H. R. Gindele, G. Reiner, U. Schnurrbusch (Hrsg.)

Schweinekrankheiten

Eugen Ulmer KG, Stuttgart 1. Auflage: 125-132.

Hodgson, A. L., J. Krywult, L. A. Corner, J. S. Rothel und A. J. Radford (1992):

Rational attenuation of Corynebacterium pseudotuberculosis: potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle.

Infect Immun 60(7): 2900-2905.

Hof, H. und R. Dörries (2004):

Grampositive, aerobe, nicht sporenbildende Stäbchenbakterien.

In: H. Hof, R. Dörries (Hrsg.)

Medizinische Mikrobiologie

Thieme Verlag, Stuttgart 3. Auflage: 323-327.

Hogg, R. A., J. Wessels, J. Hart, A. Efstratiou, A. De Zoysa, G. Mann, T. Allen und G. C. Pritchard (2009):

Possible zoonotic transmission of toxigenic Corynebacterium ulcerans from companion animals in a human case of fatal diphtheria.

Vet Rec 165(23): 691-692.

Holland, R. D., J. G. Wilkes, F. Rafii, J. B. Sutherland, C. C. Persons, K. J. Voorhees und J. O. Lay, Jr. (1996):

Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry.
Rapid Commun Mass Spectrom 10(10): 1227-1232.

Hollis, D. G. und R. E. Weaver (1981):

Gram-positive organisms: a guide to identification.
U.S. Dept. Health, Education and Welfare. Center for Disease Control, Atlanta.

Holzmann, D., G. Funke, T. Linder und D. Nadal (2002):

Turicella otitidis and Corynebacterium auris do not cause otitis media with effusion in children.
Pediatr Infect Dis J 21(12): 1124-1126.

Jones, J. E. und G. J. Dagnall (1984):

The carriage of Corynebacterium suis in male pigs.
J Hyg (Lond) 93(2): 381-388.

Kayser, F. H., E. C. Böttger, O. Haller, J. Eckert und P. Deplazes (2005):

Corynebacterium, Actinomyces, grampositive Stäbchen mit geringer Pathogenität.
In: F. H. Kayser, E. C. Böttger, O. Haller, J. Eckert, P. Deplazes (Hrsg.)
Medizinische Mikrobiologie
Thieme Verlag, Stuttgart 11. Auflage, 270-276.

Khamis, A., D. Raoult und B. La Scola (2004):

rpoB gene sequencing for identification of Corynebacterium species.
J Clin Microbiol 42(9): 3925-3931.

Khamis, A., D. Raoult und B. La Scola (2005):

Comparison between rpoB and 16S rRNA gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of Corynebacterium.
J Clin Microbiol 43(4): 1934-1936.

Kirschner, P., B. Springer, U. Vogel, A. Meier, A. Wrede, M. Kiekenbeck, F. C. Bange und E. C. Böttger (1993):

Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: report of a 2-year experience in a clinical laboratory.
J Clin Microbiol 31(11): 2882-2889.

Konrad, R., A. Berger, I. Huber, V. Boschert, S. Hörmansdorfer, U. Busch, M. Hogardt, S. Schubert und A. Sing (2010):

Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry as a tool for rapid diagnosis of potentially toxigenic *Corynebacterium* species in the laboratory management of diphtheria-associated bacteria.
Euro Surveill 15(43).

Krech, T. (1994):

Epidemiological typing of *Corynebacterium diphtheriae*.
Med. Microbiol., Lett. 3: 1-8.

Krishnamurthy, T. und P. L. Ross (1996):

Rapid identification of bacteria by direct matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of whole cells.
Rapid Commun Mass Spectrom 10(15): 1992-1996.

Lagrou, K., J. Verhaegen, M. Janssens, G. Wauters und L. Verbist (1998):

Prospective study of catalase-positive coryneform organisms in clinical specimens: identification, clinical relevance, and antibiotic susceptibility.
Diagn Microbiol Infect Dis 30(1): 7-15.

Lartigue, M. F., X. Monnet, A. Le Fleche, P. A. Grimont, J. J. Benet, A. Durrbach, M. Fabre und P. Nordmann (2005):

Corynebacterium ulcerans in an immunocompromised patient with diphtheria and her dog.
J Clin Microbiol 43(2): 999-1001.

Lawson, P. A., E. Falsen, E. Akervall, P. Vandamme und M. D. Collins (1997):

Characterization of some Actinomyces-like isolates from human clinical specimens: reclassification of *Actinomyces suis* (Soltys and Spratling) as *Actinobaculum suis* comb. nov. and description of *Actinobaculum schaalii* sp. nov.
Int J Syst Bacteriol. 47(3): 899-903.

Lipsky, B. A., A. C. Goldberger, L. S. Tompkins und J. J. Plorde (1982):

Infections caused by nondiphtheria corynebacteria.
Rev Infect Dis 4(6): 1220-1235.

Lottspeich, F. und J. W. Engels (2006):

Massenspektrometrie.
In: F. Lottspeich, J. W. Engels (Hrsg.)
Bioanalytik
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2. Auflage: 329-372.

Ludwig, W., G. Kirchhof, M. Weizenegger und N. Weiss (1992):

Phylogenetic evidence for the transfer of *Eubacterium suis* to the genus *Actinomyces* as *Actinomyces suis* comb. nov.

Int J Syst Bacteriol. 42(1): 161-165.

Martins, C., L. Faria, M. Souza, T. Camello, E. Velasco, R. Hirata, Jr., L. Thuler und A. Mattos-Guaraldi (2009):

Microbiological and host features associated with corynebacteriosis in cancer patients: a five-year study.

Mem Inst Oswaldo Cruz 104(6): 905-913.

McNamara, P. J., W. A. Cuevas und J. G. Songer (1995):

Toxic phospholipases D of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *C. ulcerans* and *Arcanobacterium haemolyticum*: cloning and sequence homology.

Gene 156(1): 113-118.

Mellmann, A., J. Cloud, T. Maier, U. Keckevoet, I. Ramminger, P. Iwen, J. Dunn, G. Hall, D. Wilson, P. Lasala, M. Kostrzewa und D. Harmsen (2008):

Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria.

J Clin Microbiol 46(6): 1946-1954.

Mims, S., H. M. Dockrell, R. Goering, I. Roitt, D. Wakelin und M. Zuckerman (2006):
Normalflora.

In: S. Mims, H. M. Dockrell, R. Goering, I. Roitt, D. Wakelin, M. Zuckerman (Hrsg.)

Medizinische Mikrobiologie

Infektiologie mit Virologie und Immunologie

Urban & Fischer Verlag, München 2. Auflage: 63-66.

Mothershed, E. A., P. K. Cassidy, K. Pierson, L. W. Mayer und T. Popovic (2002):

Development of a real-time fluorescence PCR assay for rapid detection of the diphtheria toxin gene.

J Clin Microbiol 40(12): 4713-4719.

Nagy, E., T. Maier, E. Urban, G. Terhes und M. Kostrzewa (2009):

Species identification of clinical isolates of *Bacteroides* by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry.

Clin Microbiol Infect 15(8): 796-802.

Nakao, H. und T. Popovic (1997):

Development of a direct PCR assay for detection of the diphtheria toxin gene.

J Clin Microbiol 35(7): 1651-1655.

Olender, A. und I. Letowska (2010):

[Wound infections due to opportunistic corynebacterium species].
Med Dosw Mikrobiol 62(2): 135-140.

Palacios, L., A. I. Vela, K. Molin, A. Fernandez, M. V. Latre, G. Chacon, E. Falsen und J. F. Fernandez-Garayzabal (2010):

Characterization of some bacterial strains isolated from animal clinical materials and identified as *Corynebacterium xerosis* by molecular biological techniques.
J Clin Microbiol 48(9): 3138-3145.

Pascual, C., P. A. Lawson, J. A. Farrow, M. N. Gimenez und M. D. Collins (1995):

Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16S rRNA gene sequences.
Int J Syst Bacteriol 45(4): 724-728.

Pijoan, C., A. Lastra und A. Leman (1983):

Isolation of *Corynebacterium suis* from the prepuce of boars.
J Am Vet Med Assoc 183(4): 428-429.

Pleschakowa, V., W. Leibold, G. Amtsberg, D. Konine und M. Wendt (2004):

[The prevalence of *Actinobaculum suis* in boars of breeding herds in the Omsk region (Russian Federation) by indirect immunofluorescence technique].
Dtsch Tierarztl Wochenschr 111(2): 67-69.

Podbielski, A., A. Berger, S. Dommerich, M. Donat, H. Frickmann, W. Hampel, M. Herrmann, H. Lang, H. Luckhaupt, M. Riffelmann, A. Sing, A. Spahr, U. Vogel und C. Wirsing von König (2010):

Corynebacterium diphtheriae.
In: A. Podbielski, M. Herrmann, E. Kniehl, H. Mauch, H. Rüssmann (Hrsg.)
MIQ 13: Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik
Infektionen des Mundes und der oberen Atemwege, Teil II
Urban & Fischer Verlag, München 2. Auflage: 107-113.

Reddy, C. A., C. P. Cornell und A. M. Fraga (1982):

Transfer of *Corynebacterium pyogenes* (Glage) Eberson to the genus *Actinomyces* as *Actinomyces pyogenes* (Glage) comb. nov.
Int. J. Syst. Bacteriol. 32(4): 419-429.

Riegel, P., D. de Briel, G. Prevost, F. Jehl und H. Monteil (1994):

Genomic diversity among *Corynebacterium jeikeium* strains and comparison with biochemical characteristics and antimicrobial susceptibilities.
J Clin Microbiol 32(8): 1860-1865.

Riegel, P., R. Ruimy, D. de Briel, G. Prevost, F. Jehl, R. Christen und H. Monteil (1995):
Taxonomy of *Corynebacterium diphtheriae* and related taxa, with recognition of
Corynebacterium ulcerans sp. nov. nom. rev.
FEMS Microbiol Lett 126(3): 271-276.

Rolle, M. und A. Mayr (2007a):
Bakterientoxine.
In: M. Rolle, A. Mayr, A. (Hrsg.)
Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre
Enke Verlag, Stuttgart 8. Auflage: 372-376.

Rolle, M. und A. Mayr (2007b):
Gruppe der Actinomyceten.
In: M. Rolle, A. Mayr (Hrsg.)
Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre
Enke Verlag, Stuttgart 8. Auflage: 517-535.

Roux, V., M. Drancourt, A. Stein, P. Riegel, D. Raoult und B. La Scola (2004):
Corynebacterium species isolated from bone and joint infections identified by 16S rRNA gene
sequence analysis.
J Clin Microbiol 42(5): 2231-2233.

Ruimy, R., P. Riegel, P. Boiron, H. Monteil und R. Christen (1995):
Phylogeny of the genus *Corynebacterium* deduced from analyses of small-subunit ribosomal
DNA sequences.
Int J Syst Bacteriol 45(4): 740-746.

Sauer, S. und M. Kliem (2010):
Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria.
Nat Rev Microbiol 8(1): 74-82.

Schnurrbusch, U. (2006a):
Laktation.
In: K. Heinritzi, H. R. Gindele, G. Reiner, U. Schnurrbusch
Schweinekrankheiten
Eugen Ulmer KG, Stuttgart 1. Auflage: 293-305.

Schnurrbusch, U. (2006b):
Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung männlicher Tiere.
In: K. Heinritzi, H. R. Gindele, G. Reiner, U. Schnurrbusch (Hrsg.)
Schweinekrankheiten
Eugen Ulmer KG, Stuttgart 1. Auflage: 306-344.

Schuhegger, R., R. Kugler und A. Sing (2008b):

Pitfalls with diphtheria-like illness due to toxigenic *Corynebacterium ulcerans*.
Clin Infect Dis 47(2): 288; author reply 289.

Schuhegger, R., M. Lindermayer, R. Kugler, J. Heesemann, U. Busch und A. Sing (2008a):

Detection of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* strains by a novel real-time PCR.
J Clin Microbiol 46(8): 2822-2823.

Schuhegger, R., C. Schoerner, J. Dlugaczky, I. Lichtenfeld, A. Trouillier, V. Zeller-Peronnet, U. Busch, A. Berger, R. Kugler, S. Hörmansdorfer und A. Sing (2009):

Pigs as Source for Toxigenic *Corynebacterium ulcerans*.
Emerging Infectious Diseases Journal 15(8): 1315-1316.

Schütt-Gerowitt, H. und J. Beuth (2001):

Die Gattung *Corynebacterium*, Diphtherie.
In: W. Köhler, H.J. Eggers, B. Fleischer, R. Marre, H. Pfister, G. Pulverer (Hrsg.)
Medizinische Mikrobiologie
Urban & Fischer Verlag, München 8. Auflage: 382-387.

Selbitz, H.-J. (2007):

Grupper der Actinomyceten.
In: M. Rolle, A. Mayr (Hrsg.)
Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre
Enke Verlag, Stuttgart 8. Auflage: 516-535.

Seng, P., M. Drancourt, F. Gouriet, B. La Scola, P. E. Fournier, J. M. Rolain und D. Raoult (2009):

Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry.
Clin Infect Dis 49(4): 543-551.

Seto, Y., T. Komiya, M. Iwaki, T. Kohda, M. Mukamoto, M. Takahashi und S. Kozaki (2008):

Properties of corynephage attachment site and molecular epidemiology of *Corynebacterium ulcerans* isolated from humans and animals in Japan.
Jpn J Infect Dis 61(2): 116-122.

Shukla, S. K., K. A. Bernard, M. Harney, D. N. Frank und K. D. Reed (2003b):

Corynebacterium nigricans sp. nov.: proposed name for a black-pigmented *Corynebacterium* species recovered from the human female urogenital tract.
J Clin Microbiol 41(9): 4353-4358.

Shukla, S. K., M. Harney, B. Jhaveri, K. Andrews und K. D. Reed (2003a):

Is a black-pigmented *Corynebacterium* species an opportunistic pathogen during pregnancy?
Literature review and report of 3 new cases.
Clin Infect Dis 37(6): 834-837.

Sieverding, E. (2000):

Vorbeugende Maßnahmen beim Saugferkel.
In: E. Sieverding (Hrsg.)
Handbuch Gesunde Schweine
Kluge Verlag GmbH&Co, Osnabrück 1. Auflage: 56-58.

Sing, A., A. Berger, W. Schneider-Brachert, T. Holzmann und U. Reischl (2011):

Rapid detection and molecular differentiation of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* strains by LightCycler PCR.
J Clin Microbiol 49(7): 2485-2489.

Sing, A. und J. Heesemann (2005):

Imported cutaneous diphtheria, Germany, 1997-2003.
Emerg Infect Dis 11(2): 343-344.

Sing, A., M. Hogardt, S. Bierschenk und J. Heesemann (2003):

Detection of differences in the nucleotide and amino acid sequences of diphtheria toxin from *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* causing extrapharyngeal infections.
J Clin Microbiol 41(10): 4848-4851.

Skerman, V. B. D., V. McGowan und P. H. A. Sneath (1980):

Approved lists of bacterial names.
Int. J. Syst. Bacteriol. 30(1): 225-420.

Smole, S. C., L. A. King, P. E. Leopold und R. D. Arbeit (2002):

Sample preparation of Gram-positive bacteria for identification by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight.
J Microbiol Methods 48(2-3): 107-115.

Songer, J. G. (1997):

Bacterial phospholipases and their role in virulence.
Trends Microbiol 5(4): 156-161.

Soriano, F., J. M. Aguado, C. Ponte, R. Fernandez-Roblas und J. L. Rodriguez-Tudela (1990):

Urinary tract infection caused by *Corynebacterium* group D2: report of 82 cases and review.
Rev Infect Dis 12(6): 1019-1034.

Stackebrandt, E. und J. Ebers (2006):

Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards.
microbiology today 33(4): 152-155.

Tauch, A. (2008):

Genomics of Industrially and Medically Relevant Corynebacteria.
In: A. Burkovski (Hrsg.)
Corynebacteria: genomics and molecular biology
Caister Academic Press, Norfolk, UK: 7-33.

Tauch, A., N. Bischoff, I. Brune und J. Kalinowski (2003):

Insights into the genetic organization of the *Corynebacterium diphtheriae* erythromycin resistance plasmid pNG2 deduced from its complete nucleotide sequence.
Plasmid 49(1): 63-74.

Trost, E., S. Gotker, J. Schneider, S. Schneiker-Bekel, R. Szczepanowski, A. Tilker, P. Viehoveer, W. Arnold, T. Bekel, J. Blom, K. H. Gartemann, B. Linke, A. Goesmann, A. Puhler, S. K. Shukla und A. Tauch (2010a):

Complete genome sequence and lifestyle of black-pigmented *Corynebacterium aurimucosum* ATCC 700975 (formerly *C. nigricans* CN-1) isolated from a vaginal swab of a woman with spontaneous abortion.
BMC Genomics 11: 91.

Trost, E., L. Ott, J. Schneider, J. Schroder, S. Jaenicke, A. Goesmann, P. Husemann, J. Stoye, F. A. Dorella, F. S. Rocha, C. Soares Sde, V. D'Afonseca, A. Miyoshi, J. Ruiz, A. Silva, V. Azevedo, A. Burkovski, N. Guiso, O. F. Join-Lambert, S. Kayal und A. Tauch (2010b):

The complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41 isolated from a 12-year-old girl with necrotizing lymphadenitis reveals insights into gene-regulatory networks contributing to virulence.
BMC Genomics 11: 728.

Turner, G. V. (1982):

A microbiological study of polyarthritis in slaughter pigs.
J S Afr Vet Assoc 53(2): 99-101.

van Veen, S. Q., E. C. J. Claas und E. J. Kuijper (2010):

High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories.
J Clin Microbiol 48(3): 900-907.

Vaneechoutte, M., P. Riegel, D. de Briel, H. Monteil, G. Verschraegen, A. De Rouck und G. Claeys (1995):

Evaluation of the applicability of amplified rDNA-restriction analysis (ARDRA) to identification of species of the genus *Corynebacterium*.
Res Microbiol 146(8): 633-641.

Vela, A. I., E. Gracia, A. Fernandez, L. Dominguez und J. F. Fernandez-Garayzabal (2006):

Isolation of *Corynebacterium xerosis* from animal clinical specimens.
J Clin Microbiol 44(6): 2242-2243.

Vela, A. I., A. Mateos, M. D. Collins, V. Briones, R. A. Hutson, L. Dominguez und J. F. Fernandez-Garayzabal (2003):

Corynebacterium suicordis sp. nov., from pigs.
Int J Syst Evol Microbiol 53(6): 2027-2031.

von Graevenitz, A., V. Punter-Streit, P. Riegel und G. Funke (1998):

Coryneform bacteria in throat cultures of healthy individuals.
J Clin Microbiol 36(7): 2087-2088.

Wauters, G., B. Van Bosterhaut, V. Avesani, R. Cuvelier, J. Charlier, M. Janssens und M. Delmée (2000):

Peritonitis Due to *Brevibacterium otitidis* in a Patient Undergoing Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis.
J Clin Microbiol 38(11): 4292-4293.

Wegienek, J. und C. A. Reddy (1982):

Taxonomic study of '*Corynebacterium suis*' Soltys and Spratling: proposal of *Eubacterium suis* (nom. rev.) comb. nov.
Int J Syst Bacteriol 32(2): 218-228.

Wendt, M., M. Liebhold, F. Kaup, G. Amtsberg und W. Bollwahn (1990):

[*Corynebacterium suis* infection in swine. 1. Clinical diagnosis with special consideration of urine studies and cystoscopy].
Tierarztl Prax 18(4): 353-357.

Wilson, A. P., S. Matthews, M. Bahl, A. Efstratiou und B. D. Cookson (1992):

Screening for *Corynebacterium diphtheriae*.
J Clin Pathol 45(11): 1036-1037.

Wittmann, C. und E. Heinzle (2001a):

Application of MALDI-TOF MS to lysine-producing *Corynebacterium glutamicum*: a novel approach for metabolic flux analysis.

Eur J Biochem 268(8): 2441-2455.

Wittmann, C. und E. Heinzle (2001b):

MALDI-TOF MS for quantification of substrates and products in cultivations of *Corynebacterium glutamicum*.

Biotechnol Bioeng 72(6): 642-647.

Wouda, W., J. M. Snijders, M. J. van den Broek, E. Gruys und J. G. van Logtestijn (1987):

[Endocarditis and meat inspection in slaughtering pigs. 1. Clinical, pathological and microbiological aspects].

Tijdschr Diergeneeskd 112(21): 1226-1235.

Zhao, H. K., K. Yonekawa, T. Takahashi, N. Kikuchi, T. Hiramune und R. Yanagawa (1993):

Isolation of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from the cervical canal of clinically normal sows.

Res Vet Sci 55(3): 356-359.

Zinkernagel, A. S., A. von Graevenitz und G. Funke (1996):

Heterogeneity within *Corynebacterium minutissimum* strains is explained by misidentified *Corynebacterium amycolatum* strains.

Am J Clin Pathol 106(3): 378-383.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Morphologie ausgewählter coryneformer Bakterien modifiziert nach FUNKE und BERNARD (2007)	3
Tabelle 2: Identifizierung klinisch relevanter <i>Corynebacterium spp.</i> nach FUNKE und BERNARD (2007)	5
Tabelle 3: Identifizierung klinisch relevanter coryneformer Bakterien nach FUNKE und BERNARD (2007)	6
Tabelle 4: Coryneforme Bakterien als Krankheitserreger und beteiligte Erreger von Krankheiten modifiziert nach FUNKE und BERNARD (2007)	13
Tabelle 5: Einteilung der Hygienestatus anhand des Hygienescores	23
Tabelle 6: Einteilung der API Coryne Ergebnisse	25
Tabelle 7: MasterMix mit AmpliTaq DNA Polymerase	28
Tabelle 8: MasterMix mit HotStarTaq MasterMix	29
Tabelle 9: Einteilung der Sequenzierungsergebnisse	31
Tabelle 10: Statistische Berechnungsverfahren untersuchter Einflussfaktoren	32
Tabelle 11: Zuordnung der untersuchten Betriebe zu Regierungsbezirk und Betriebsart	34
Tabelle 12: Übersicht über die isolierten Spezies während des Methodenvergleichs	39
Tabelle 13: Isolate, die mittels der drei verwendeten Methoden auf Speziesebene identifiziert werden konnten	40
Tabelle 14: Aufteilung der positiven Tiere entsprechend ihres Alters	43
Tabelle 15: Aufteilung der positiven Tiere nach den einzelnen Betriebsarten	45
Tabelle 16: Einteilung der Betriebe anhand des Hygienescores in die drei Hygienestatus	51
Tabelle 17: Verteilung der <i>Corynebacterium</i> - und coryneforme Bakterien-positiven Personen und Betriebe	53
Tabelle 18: Die nasale <i>Corynebacterium</i> -Flora von Betriebsangehörigen schweinehaltender Betriebe identifiziert durch MALDI-TOF MS	54
Tabelle 19: Isolierte <i>Corynebacterium spp.</i> und coryneforme Bakterien bei einem Ausbruchsgeschehen in einem landwirtschaftlichen Betrieb	56
Tabelle 20: Primersequenzen der <i>rpoB</i> -Primer mit degenerierten Basen (KHAMIS et al. 2004)	118
Tabelle 21: Primersequenzen der <i>rpoB</i> -Primer ohne degenerierten Basen (Dr. I. Huber, LGL, persönliche Mitteilung)	118
Tabelle 22: Primersequenzen der 16S rDNA-Primer (KIRSCHNER et al. 1993)	118
Tabelle 23: Temperatur-Zeit-Profil für die <i>rpoB</i> -PCR mit AmpliTaq DNA Polymerase	119
Tabelle 24: Temperatur-Zeit-Profil für die <i>rpoB</i> -PCR mit HotStarTaq MasterMix	119
Tabelle 25: Temperatur-Zeit-Profil für 16S rDNA-PCR mit AmpliTaq DNA Polymerase ..	119

Tabelle 26: Isolate, die mit MALDI-TOF MS und 16S rDNA-Sequenzierung auf Speziesebene identifiziert werden konnten	127
Tabelle 27: Isolate, die mit API Coryne und 16S rDNA-Sequenzierung auf Speziesebene identifiziert werden konnten.....	127
Tabelle 28: Isolate, die mit MALDI-TOF MS und API Coryne auf Speziesebene identifiziert werden konnten	128
Tabelle 29: Ausgewählte Isolate, bei denen MALDI-TOF MS und <i>rpoB</i> -Sequenzierung dieselbe Speziesidentifizierung lieferten	128
Tabelle 30: Zusammensetzung der nasalen <i>Corynebacterium</i> -Flora und verwandter Arten bei Schweinen unterschiedlicher Altersklassen	129
Tabelle 31: Zusammensetzung der nasalen <i>Corynebacterium</i> -Flora und verwandter Arten bei Schweinen unterschiedlicher Betriebsarten.....	129
Tabelle 32: Aufteilung der positiven Tiere nach den beteiligten Regierungsbezirken	130
Tabelle 33: Zusammensetzung der nasalen <i>Corynebacterium</i> -Flora und verwandter Arten bei Schweinen unterschiedlicher Regionen.....	130
Tabelle 34: Zusammensetzung der nasalen und tonsillären <i>Corynebacterium</i> -Flora bei Schweinen.....	130
Tabelle 35: Anteil der 41 Betriebe eingeteilt in die drei Hygienestatus und die Betriebsarten	131
Tabelle 36: Zusammensetzung der nasalen <i>Corynebacterium</i> -Flora und verwandter Arten bei Schweinen in Abhängigkeit von bestimmten Betriebsparametern.....	131

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Funktionsweise der MALDI-TOF MS.....	18
Abbildung 2: Beispiel einer Ergebnisliste basierend auf der Score Value Berechnung mittels MALDI Biotyper	19
Abbildung 3: Anteil der Produktionsformen an den insgesamt 41 beprobten Betrieben.....	33
Abbildung 4: Verteilung der beprobten Betriebe über Bayern	34
Abbildung 5: Vergleich des Identifizierungspotentials von API Coryne, MALDI-TOF MS und 16S rDNA-Sequenzierung für <i>Corynebacterium spp.</i> und nah verwandte coryneforme Bakterien aller untersuchten 329 Isolate	35
Abbildung 6: Vergleich des Identifizierungspotentials von API Coryne, MALDI-TOF MS und 16S rDNA-Sequenzierung für <i>Corynebacterium spp.</i> und nah verwandte coryneforme Bakterien der 158 porcinen Isolate	36
Abbildung 7: Vergleich des Identifizierungspotentials von API Coryne, MALDI-TOF MS und 16S rDNA-Sequenzierung für <i>Corynebacterium spp.</i> und nah verwandte coryneforme Bakterien der 171 humanen Isolate.....	36
Abbildung 8: Identifizierungspotential mit Konfidenzintervallen von API Coryne, MALDI-TOF MS und 16S rDNA-Sequenzierung auf Speziesebene	37
Abbildung 9: Feststellung der Sensitivität der MALDI-TOF MS anhand der Konfidenzintervalle	38
Abbildung 10: Zusammensetzung der nasalen <i>Corynebacterium</i> -Flora und verwandter Arten bei Schweinen unterschiedlicher Altersklassen.....	44
Abbildung 11: Vorkommen von <i>Brevibacterium stationis</i> mit Konfidenzintervallen bezogen auf die unterschiedlichen Altersklassen	45
Abbildung 12: Zusammensetzung der nasalen <i>Corynebacterium</i> -Flora und verwandter Arten bei Schweinen unterschiedlicher Betriebsarten.....	46
Abbildung 13: Aufteilung der positiven Tiere nach den beteiligten Regierungsbezirken	47
Abbildung 14: Zusammensetzung der nasalen <i>Corynebacterium</i> -Flora und verwandter Arten bei Schweinen unterschiedlicher Regionen.....	47
Abbildung 15: Vorkommen von <i>Brevibacterium stationis</i> mit Konfidenzintervallen bezogen auf die unterschiedlichen Regionen.....	48
Abbildung 16: Darstellung der nasalen und tonsillären <i>Corynebacterium</i> -Flora bei Schweinen	49
Abbildung 17: Vorkommen der drei häufigsten Stämme bei Nasen- und Tonsillentupferproben mit Konfidenzintervallen	50
Abbildung 18: Anteil der 41 Betriebe eingeteilt in die drei Hygienestatus und die Betriebsarten.....	51
Abbildung 19: Keimpektrum aufgeteilt nach den Hygienestatus	52
Abbildung 20: Skizze der Stallungen und der Verteilung der beprobten Tiere	56

Anhang

Anlage 1: Einverständniserklärung beprobter Personen

Probennummer _____

Nachname _____ Vorname _____

Wohnhaft in _____

☐ Landwirt/-in

☐ Familienmitglied mit Tierkontakt im Betrieb

Wann sind Sie geboren

Tag

Monat

Jahr

--	--	--	--	--	--

Geschlecht:

☐ weiblich

☐ männlich

Einverständniserklärung

Hiermit erkläre ich mich mit der Probennahme im Rahmen der Corynebacterium ulcerans-Studie einverstanden und stimme einer anonymen Auswertung meiner Daten zu wissenschaftlichen Zwecken zu.

Die Proben werden im Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL), Oberschleißheim untersucht.

Ich möchte über das Untersuchungsergebnis vom Landesamt telefonisch unterrichtet werden.

☐ ja

☐ nein

wenn ja,

Telefonnummer: _____

Ort, Datum

Unterschrift

Die Probennahme wird durch einen Mitarbeiter der Klinik für Schweine der LMU in Oberschleißheim durchgeführt und im Labor des LGL bearbeitet.

Das Ergebnis wird Ihnen von Mitarbeitern des Landesamtes mitgeteilt, die Ihnen, sofern Sie es wünschen, bei Fragen zum Thema *Corynebacterium ulcerans* zur Verfügung stehen.

Die Befragung liegt nicht im Verantwortungsbereich der Schweineklinik.

Anlage 2: Handout für Landwirte

Was ist *Corynebacterium ulcerans*?

Corynebacterium ulcerans (*C. ulcerans*) gehört zur artenreichen Gattung der Corynebakterien, die zum Teil auf Pflanzenresten als ungefährliche Umweltkeime oder auch auf Schleimhaut und Haut von Mensch und Tier vorkommen können. In der Regel verursachen sie keine Krankheiten, aber es gibt auch einige wenige für Menschen und Tiere pathogene Stämme.

C. ulcerans gehört neben *C. diphtheriae* und *C. pseudotuberculosis* zu den Erregern, die in eher selteneren Fällen Diphtherie verursachen können, wenn sie die Fähigkeit besitzen ein Diphtherietoxin zu produzieren.

Wie sehen die Krankheitssymptome von Diphtherie beim Menschen aus?

Es können lokal begrenzte Formen auftreten, die teils mit uncharakteristischen, grippeähnlichen Symptomen (Tonsillen-/Rachendiphtherie) einhergehen. Auch Heiserkeit bis hin zu Stimmverlust, Husten und Atemnot (Kehlkopfdiphtherie) oder relativ milde Verläufe, wie typisch blutig-schleimiger Nasenausfluss (Nasendiphtherie) sind bezeichnend. Es können aber auch Symptome in Form von Haut- oder Wunddiphtherie auftreten.

Können Tiere *C. ulcerans* tragen?

C. ulcerans – Stämme sind bisher unter anderem bei Milchvieh mit Mastitiden und Schweinen, aber auch bei Haustieren wie Hunden und Katzen vorgekommen. Jedoch sind die Krankheitsverläufe dort meist symptomlos.

Wie kann sich der Mensch mit *C. ulcerans* infizieren?

Die Diphtherie wird in der Regel durch Tröpfchen- oder seltener durch Schmierinfektionen bei engem Kontakt zu einem Erkrankten oder einem unauffälligen Bakterienträger erworben.

Eine indirekte Übertragung durch kontaminiertes Material ist prinzipiell möglich, aber selten.

Kann sich der Mensch durch Kontakt mit Tieren infizieren?

Der Kontakt mit besiedelten Tieren kann zu einer Besiedelung des Menschen mit *C. ulcerans* führen.

Im Sommer 2007 wurde in Deutschland der erste Fall einer mit toxischen *C. ulcerans* assoziierten Erkrankung der oberen Luftwege mit Übertragung auf den Menschen bei einer Hauskatze bearbeitet.

Bei einem Vorfall im Dezember 2007 wurde ein Schwein als Träger und als Infektionsquelle für den Menschen festgestellt.

Was kann jeder Tierhalter selbst tun, um sich gegen *C. ulcerans* zu schützen?

Für den Schutz gegen eine Besiedelung durch *C. ulcerans* gelten die üblichen Hygieneempfehlungen für den Umgang mit Tieren:

- nach dem Kontakt mit Tieren Hände gründlich mit Wasser und Seife waschen
- zudem sollte man vermeiden Tiere mit dem Mund zu berühren

Des Weiteren kann man sich prophylaktisch durch eine Impfung schützen. Sollte diese aber alle 10 Jahre auffrischen um einen sicheren Impfschutz zu haben, wobei hier aber auch zu erwähnen ist, dass die Wirkung des regulären Diphtherie-Impfstoffes gegen *C. ulcerans* noch genauer untersucht werden muss.

Betriebsbogen *Corynebakterium ulcerans*

Landwirt: _____

Hoftierarzt: _____

Datum: _____

Betriebsart: ☐ Ferkelerzeuger ☐ Mast
☐ Zucht ☐ geschlossener Betrieb

Betriebsgröße:	Stallplätze:	Anzahl Tiere:
	Muttersauen:	_____
	Eber:	_____
	Aufzuchtferkel:	_____
	Mastplätze:	_____

☐ Ausschließlich Eigennachzucht

O Zukauf Genetik: _____

O von einem Betrieb O von mehreren

Quarantäne: O nein O ja wie lange _____
 O separater Stall O Eingliederungsstall

Mischbetrieb: ☐ nein ☐ ja
☐ Rinder ☐ Geflügel
☐ Pferde

Kontakt anderer Tierarten mit Schweinen: O nein O ja

Wenn ja: O Hund O Katze O Rinder O Geflügel O Pferde

Hygienemanagement:

Personen mit Tierkontakt: ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ mehr als 3

Hygieneschleuse: ☐ mit Dusche ☐ ohne Dusche ☐ nicht vorhanden

Schutzkleidung vorhanden: ☐ nein ☐ ja

Schadnagerbekämpfung: ☐ nein ☐ Betriebsintern ☐ Betriebsextern

Routinemaßnahmen bei Ferkeln:

Kastration: Tag_____

Schwanz kupieren: Tag_____

Zähne schleifen: Tag_____

Eiseninjektion: Tag_____

Impfungen: _____

Stall-/einrichtung**Ferkel**

Flatdeck:

Art der Aufstallung: ☐ Flatdeck
 ☐ Bettenstall
 ☐ Stroh/ Außenklima

Anzahl Abteile: _____

Anzahl Buchten pro Abteil (z.B. 3x12): _____

Anzahl Ferkel pro Bucht: _____

Boden: ☐ Vollspaltenboden
☐ Teilspaltenboden
☐ Stroh

Material: ☐ Kunststoff
☐ Dreikant
☐ Gussrosten
☐ Wärmeplatte
☐ Beton
☐ Stroh

Spielmaterial: ☐ Stroh ☐ Ketten ☐ Bälle ☐ sonstiges_____

Belegung: ☐ kontinuierlich ☐ rein-raus

Stabile Gruppe: ☐ ja ☐ nein
Sortierbucht: ☐ ja ☐ nein
Krankenabteil: ☐ ja ☐ nein

Mastschweine

Art der Aufstallung: ☐ Vollspaltenboden
☐ Teilspaltenboden
☐ Stroh

Reinigung: ☐ nein ☐ ja
Desinfektion: ☐ nein ☐ ja
Stall steht vor Neueinstellung leer: ☐ nein ☐ ja wie langen:_____
Spielmaterial: ☐ Stroh ☐ Ketten ☐ Bälle ☐ sonstiges_____

Belegung: ☐ kontinuierlich ☐ rein-raus

Stabile Gruppe: ☐ ja ☐ nein
Sortierbucht: ☐ ja ☐ nein
Krankenabteil: ☐ ja ☐ nein

Alttiere**Deckbereich:**

Art der Aufstallung: ☐ Kastenstände dauernd fest
 ☐ Kastenstände mit Freilauf
 ☐ Gruppenhaltung

Reinigung: ☐ nein ☐ ja

Desinfektion: ☐ nein ☐ ja

Stall steht vor Neueinstellung leer: ☐ nein ☐ ja wie langen:_____

Wartebereich:

Aufenthaltsdauer: _____Tage

Anzahl Plätze: _____

Art der Aufstallung: ☐ Kastenstände dauernd fest
 ☐ Kastenstände mit Freilauf
 ☐ Gruppenhaltung

Reinigung: ☐ nein ☐ ja

Desinfektion: ☐ nein ☐ ja

Stall steht vor Neueinstellung leer: ☐ nein ☐ ja wie langen:_____

Abferkelbereich:

Anzahl Plätze: _____

Art der Aufstallung: ☐ Kastenstände ☐ andere Aufstallung

Ferkelnest: ☐ mit Deckel ☐ ohne Deckel
 ☐ mit Wärmelampe ☐ ohne Wärmelampe
 ☐ mit Wärmeplatte ☐ ohne Wärmeplatte

Temperatur Abteil: _____°C Temperatur Nest: _____°C

Reinigung: ☐ nein ☐ ja

Desinfektion: ☐ nein ☐ ja

Stall steht vor Neueinstellung leer: ☐ nein ☐ ja wie langen _____

Einzeltiere Ferkel

Vorkommen von Krankheiten: ☐ selten ☐ mäßig ☐ häufig

Welcher Art: _____

Therapie: _____

Einsatz von Antibiotika ☐ nein ☐ ja

Welcher: _____

Über welchen Zeitraum: _____Tage _____Wochen

Einsatz mehrerer Antibiotika während Krankheitsverlauf: ☐ nein ☐ ja

Welche: _____

Therapieerfolg im Anfangsstadium: ☐ Sehr gut ☐ gut

☐ befriedigend ☐ schlecht

Therapieerfolg im fortgeschr. Stadium: ☐ Sehr gut ☐ gut

☐ befriedigend ☐ schlecht

Bestand Ferkel

Standardmedikationen: ☐ nein ☐ ja

Eingesetzte Medikamente: _____

Vorkommen von Krankheiten: ☐ selten ☐ mäßig ☐ häufig

Welcher Art: _____

Therapie: _____

Einsatz von Antibiotika ☐ nein ☐ ja

Welche: _____

Über welchen Zeitraum: _____Tage _____Wochen

Einsatz mehrerer Antibiotika während Krankheitsverlauf: ☐ nein ☐ ja

Welche: _____

Therapieerfolg im Anfangsstadium: ☐ Sehr gut ☐ gut

☐ befriedigend ☐ schlecht

Therapieerfolg im fortgeschr. Stadium: ☐ Sehr gut ☐ gut

☐ befriedigend ☐ schlecht

Impfungen: _____

Einzeltiere Mastschweine

Vorkommen von Krankheiten: ☐ selten ☐ mäßig ☐ häufig

Welcher Art: _____

Therapie:

Einsatz von Antibiotika ☐ nein ☐ ja

Welche: _____

Zeitraum: Tage Wochen

Über welchen Zeitraum: _____Tage _____Wochen

Einsatz mehrerer Antibiotika während Krankheitsverlauf: ☐ nein ☐ ja

Welche: _____

Therapieerfolg im Anfangsstadium: ☐ Sehr gut ☐ gut

☐ befriedigend ☐ schlecht

Therapieerfolg im fortgeschr. Stadium: ☐ Sehr gut ☐ gut

☐ befriedigend ☐ schlecht

Bestand Mastschweine

Standardmedikationen: ☐ nein ☐ ja

Eingesetzte Medikamente: _____

Vorkommen von Krankheiten: ☐ selten ☐ mäßig ☐ häufig

Welcher Art: _____

Therapie: _____

Einsatz von Antibiotika ☐ nein ☐ ja

Welche: _____

Über welchen Zeitraum: _____Tage _____Wochen

Einsatz mehrerer Antibiotika während Krankheitsverlauf: ☐ nein ☐ ja

Welche: _____

Therapieerfolg im Anfangsstadium: ☐ Sehr gut ☐ gut
 ☐ befriedigend ☐ schlecht

☐ befriedigend ☐ schlecht

Therapieerfolg im fortgeschr. Stadium: ☐ Sehr gut ☐ gut
☐ befriedigend ☐ schlecht

☐ befriedigend ☐ schlecht

Impfungen: _____

Einzeltiere Alttiere

Vorkommen von Krankheiten: ☐ selten ☐ mäßig ☐ häufig

Welcher Art: _____

Therapie: _____

Einsatz von Antibiotika ☐ nein ☐ ja

Welche: _____

Über welchen Zeitraum: _____Tage _____Wochen

Einsatz mehrerer Antibiotika während Krankheitsverlauf: ☐ nein ☐ ja

Welche: _____

Therapieerfolg im

Anfangsstadium: ☐ Sehr gut ☐ gut ☐ befriedigend ☐ schlecht

Therapieerfolg im

fortgeschr. Stadium: ☐ Sehr gut ☐ gut ☐ befriedigend ☐ schlecht

Bestand Alttiere

Standardmedikationen: ☐ nein ☐ ja

Eingesetzte Medikamente: _____

Vorkommen von Krankheiten: ☐ selten ☐ mäßig ☐ häufig

Welcher Art: _____

Therapie: _____

Einsatz von Antibiotika ☐ nein ☐ ja

Welche: _____

Über welchen Zeitraum: _____Tage _____Wochen

Einsatz mehrerer Antibiotika während Krankheitsverlauf: ☐ nein ☐ ja

Welche: _____

Therapieerfolg im Anfangsstadium:

<input type="radio"/> Sehr gut	<input type="radio"/> gut
<input type="radio"/> befriedigend	<input type="radio"/> schlecht

☐ befriedigend ☐ schlecht

Therapieerfolg im fortgeschr. Stadium: ☐ Sehr gut ☐ gut
☐ befriedigend ☐ schlecht

☐ befriedigend ☐ schlecht

Impfungen: _____

Haustiere:

Tierart: ☐ Hund ☐ Katze
Erkrankungen: ☐ nie ☐ selten ☐ gelegentlich ☐ häufig

Art der Erkrankung: _____

Aufenthalt in Tierklinik/Praxis: ☐ nein ☐ ja

evtl. Operationen: ☐ nein ☐ ja

(auch am Hof durch HTA)

Probleme bei Wundheilung/Infektionen: ☐ nein ☐ ja

Sonstiges: _____

Tierart: ☐ Hund ☐ Katze
Erkrankungen: ☐ nie ☐ selten ☐ gelegentlich ☐ häufig

Art der Erkrankung: _____

Aufenthalt in Tierklinik/Praxis: ☐ nein ☐ ja

Evtl. Operationen: ☐ nein ☐ ja

(auch am Hof durch HTA)

Probleme bei Wundheilung/Infektionen: ☐ nein ☐ ja

Sonstiges: _____

Anlage 4: Liste der verwendeten Reagenzien

Anlage 4.1 MALDI-TOF MS

Anlage 4.1.1 Herstellung der Organic Suspension -Lösung

500 µl Acetonitril (Fa. Carl Roth GmbH + Co. KG., Karlsruhe)

475 µl DEPC-Wasser (Fa. MoBio Laboratories, CA 92008, USA)

25 µl Trifluoressigsäure (> 99,9%, Fa. Carl Roth GmbH + Co. KG., Karlsruhe)

In 1,5 ml Tube (Fa. Eppendorf AG, 22331 Hamburg) mischen. Bei Raumtemperatur lagern.

Anlage 4.1.2 Herstellung der Matrix-Lösung

2,5 mg α -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure (α -HCCA, Fa. Bruker Daltonics, Bremen) mit 250 µl OS gut mischen. Bei Raumtemperatur lagern.

Anlage 4.1.3 Herstellung des Bakterienstandards für die MALDI-TOF MS

50 µl OS in den portionierten, getrockneten *Escherichia coli*-Standard (Fa. Bruker Daltonics, Bremen) geben und gut mischen. Bei -20°C lagern.

Anlage 4.2 PCR

Anlage 4.2.1 Gebrauchslösungen für Extraktion

Anlage 4.2.1.1 Herstellung der Lysozym-Gebrauchslösung

10 mg/ml Lysozym (L-7651, Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) in 10 mM Tris-HCl (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen), pH 8,0, lösen und bei -20°C lagern.

Anlage 4.2.1.2 Herstellung der 1x PBS-Gebrauchslösung

10x PBS (Fa. Fluka, Oberhaching) 1:10 mit Aqua dest. verdünnen, pH 7,4

Anlage 4.2.2 Gebrauchslösungen für MasterMix

Anlage 4.2.2.1 Herstellung des dNTP-Mix

Die vier Nukleotid-Stammlösungen (10 mM) (Fa. Applied Biosystems, CA 94404, USA) 1:1:1:1 mischen => dNTP-Mix 2,5 mM pro Nukleotid.

Anlage 4.2.3 Primer

Alle in der Arbeit verwendete Primer wurden von der Fa. Tib MolBiol, Berlin bezogen.

Herstellung: Stammlösung mit 0,1% TE-Puffer: 100 µM

Gebrauchslösung mit Wasser, PCR-grade: 10 µM

Anlage 4.2.3.1 *rpoB*-Primer

Tabelle 20: Primersequenzen der *rpoB*-Primer mit degenerierten Basen (KHAMIS et al. 2004)

Oligonukleotid	Sequenz
C2700 Forward	5` - CGW ATG AAC ATY GGB CAG GT -3`
C3130 Reverse	5` - TCC ATY TCR CCR AAR CGC TG -3`

Tabelle 21: Primersequenzen der *rpoB*-Primer ohne degenerierten Basen (Dr. I. Huber, LGL, persönliche Mitteilung)

Oligonukleotid	Sequenz
Cxe2718-fw	5` - CGA ATG AAC ATC GGC CAG GT -3`
Cxe3139-re	5` - TCC ATC TCG CCG AAG CGC TG -3`

Anlage 4.2.3.2 16S rDNA-Primer

Tabelle 22: Primersequenzen der 16S rDNA-Primer (KIRSCHNER et al. 1993)

Oligonukleotid	Sequenz
fd1-forward	5` - AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3`
800r-reverse	5` - GAG TAC CAG GGT ATC TAA TCC -3`

Anlage 4.2.4 Temperatur-Zeit-Profile

Tabelle 23: Temperatur-Zeit-Profil für die *rpoB*-PCR mit AmpliTaq DNA Polymerase

Phase	Temperatur	Zeit in min
Initiale Denaturierung	98°C	02:00
Denaturierung 35x Annealing Elongation	94°C	00:30
	61°C	00:30
	72°C	02:00
Finale Elongation	72°C	10:00
Hold	10°C	forever

Tabelle 24: Temperatur-Zeit-Profil für die *rpoB*-PCR mit HotStarTaq MasterMix

Phase	Temperatur	Zeit in min
Initiale Denaturierung	95°C	15:00
Denaturierung 35x Annealing Elongation	94°C	00:45
	61°C	00:45
	72°C	01:00
Finale Elongation	72°C	07:00
Hold	10°C	forever

Tabelle 25: Temperatur-Zeit-Profil für 16S rDNA-PCR mit AmpliTaq DNA Polymerase

Phase	Temperatur	Zeit in min
Initiale Denaturierung	98°C	02:00
Denaturierung 35x Annealing Elongation	94°C	00:30
	55°C	00:30
	72°C	01:30
Finale Elongation	72°C	7:00
Hold	10°C	forever

Anlage 4.3 Liste der Chemikalien, Geräte und Materialien, aufgegliedert nach den entsprechenden Durchführungsschritten

Materialien für Probennahme

MATERIAL	VERWENDUNGSZWECK/ERKLÄRUNG	FIRMA
Oberkieferschlinge	Für die Fixation der Schweine	Fa. Schippers GmbH, Kerken
Portagerm™Amies Agar + Wattetupfer	Wattetupfer für Nasen- und Tonsillenproben inklusive Transportmedium	Fa. Copan, 25125 Brescia, Italien

Materialien für Anzucht

MATERIAL	VERWENDUNGSZWECK/ERKLÄRUNG	FIRMA
BD BBL™ GasPak™ 150 Systems	Anaerobiertopf	Fa. BD Diagnostic Systems, Heidelberg
BD Tellurit Agar (Hoyle)	Selektivnährmedium für Corynebakterien	Fa. BD Diagnostic Systems, Heidelberg
Columbia Agar mit 5% Schafblut	Anzucht der Corynebakterien-Reinkulturen	Fa. Oxoid Deutschland GmbH, Wesel
CO ₂ Gen	Für die Herstellung einer mikroaerophilen Atmosphäre mit 5% CO ₂	Fa. Oxoid Deutschland GmbH, Wesel
Impfnadeln im Röhrchen/50 Stück	Zum Abnehmen einzelner Kolonien (Subkultivierung)	Fa. VWR International GmbH, Darmstadt
Impfösen, flexibel, 10 µl, im Röhrchen/50 Stück	Für Dreiösendausstrich	Fa. VWR International GmbH, Darmstadt

Materialien für Gram-Färbung

MATERIAL	VERWENDUNGSZWECK/ERKLÄRUNG	FIRMA
Grams Kristallviolettlösung	Basischer Farbstoff zur Blaufärbung	Fa. Merck KGaA, Darmstadt
Grams Lugols Lösung	Jodlösung zur Lackebildung mit Kristallviolett	Fa. Merck KGaA, Darmstadt
Grams Entfärbelösung	Für den entfärbenden Zwischenschritt	Fa. Merck KGaA, Darmstadt
Grams Safraninlösung	Roter Kontrastfarbstoff zum Gegenfärben	Fa. Merck KGaA, Darmstadt
Immersionsöl	Zur Verbesserung der Auflösung bei der mikroskopischen Untersuchung	Fa. Merck KGaA, Darmstadt
Impfösen, flexibel, 10 µl, im Röhrchen/50 Stück	Für das Ausstreichen der Bakterien auf dem Objektträger	Fa. VWR International GmbH, Darmstadt
Laborlux 12	Lichtmikroskop	Fa. Leitz Wetzlar GmbH, Wetzlar
Objektträger	Für das Anlegen der Gram-Präparate	Fa. Süsse GmbH, Gudensberg

Materialien Katalase-Test

MATERIAL	VERWENDUNGSZWECK/ERKLÄRUNG	FIRMA
ID Color Katalase	Für den Nachweis Katalase-bildender Corynebakterien durch Blasenbildung	Fa. bioMérieux™ Deutschland GmbH, Nürtingen
Impfösen, flexibel, 10 µl, im Röhrchen/50 Stück	Für das Ausstreichen der Bakterien auf dem Objektträger	Fa. VWR International GmbH, Darmstadt
Objektträger	Unterlage für Katalase-Test	Fa. Süsse GmbH, Gudensberg

Materialien für API Coryne

MATERIAL	VERWENDUNGSZWECK/ERKLÄRUNG	FIRMA
API™ Coryne	Kit für den Nachweis von Corynebakterien durch 12 enzymatische und 9 Kohlenhydratfermentations-Tests	Fa. bioMérieux™ Deutschland GmbH, Nürtingen
Columbia Agar mit 5% Schafblut	Kontrollplatten für Kontrolle der Kulturreinheit	Fa. Oxoid Deutschland GmbH, Wesel
Impfösen, flexibel, 10 µl, im Röhrchen/50 Stück	Für den Dreiösenausstrich der API Kontrollplatte	Fa. VWR International GmbH, Darmstadt
NIT 1 und NIT 2	Je einen Tropfen in den Test NIT geben, um die Reaktion ablesen zu können	Fa. bioMérieux™ Deutschland GmbH, Nürtingen
Parafinöl	Für die Herstellung eines anaeroben Milieus für einzelne API Tests	Fa. bioMérieux™ Deutschland GmbH, Nürtingen
PYZ	Einen Tropfen in den Test PYZ geben, um die Reaktion ablesen zu können	Fa. bioMérieux™ Deutschland GmbH, Nürtingen
Transferpipetten 3,5ml, steril	Einwegpipetten für das Beladen der API Coryne Systeme	Fa. Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Wattetupfer, steril	Für das Abtragen von Bakterienkolonien von Agarplatten und die Herstellung von Bakteriensuspensionen	Fa. bioMérieux™ Deutschland GmbH, Nürtingen
ZYM A und ZYM B	Je einen Tropfen in die Tests PyrA bis βNAG geben, um die Reaktion ablesen zu können	Fa. bioMérieux™ Deutschland GmbH, Nürtingen

Materialien für Stammasservierung

MATERIAL	VERWENDUNGSZWECK/ERKLÄRUNG	FIRMA
CRYOBANK	Cryobank-Röhrchen	Fa. Mast Diagnostic Laboratoriums-Präparate GmbH, Reinfeld
Transferpipetten 3,5ml, steril	Einwegpipetten für das Entfernen überschüssiger Flüssigkeit	Fa. Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Wattetupfer, steril	Für das Abtragen von Bakterienkolonien von Agarplatten und Überimpfen in Cryobank	Fa. bioMérieux™ Deutschland GmbH, Nürtingen

Materialien für MALDI-TOF MS

MATERIAL	VERWENDUNGSZWECK/ERKLÄRUNG	FIRMA
α –HCCA	α -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure: Bestandteil der Matrix-Lösung; mit 250 μ l organischer Lösung lösen	Fa. Bruker Daltonics, Bremen
Acetonitril > 99,9%	Zur Resuspension der Bakterienpellets nach dem Trocknen und Bestandteil der organischen Lösung	Fa. Carl Roth GmbH + Co. KG., Karlsruhe
Ameisensäure 70%	Zur Resuspension der Bakterienpellets nach dem Trocknen	Fa. Carl Roth GmbH + Co. KG., Karlsruhe
DEPC Treated Water	Zur Erstellung der Bakteriensuspension aus Corynebakterien-Reinkulturen und Bestandteil der organischen Lösung	Fa. MoBio Laboratories, CA 92008, USA
Eppendorf Centrifuge 5430	Zentrifuge	Fa. Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Dualfilter epT.I.P.S., 0,1 – 1000 μ l	Filtertips für Kolbenhubpipetten	Fa. Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Reference™ (variabel und fix)	Kolbenhubpipetten für 0,1 – 1000 μ l	Fa. Eppendorf AG, Hamburg
<i>Escherichia coli</i> DH5alpha	Getrockneter Bakterienstandard für die MALDI-TOF MS; in 50 μ l organischer Lösung lösen	Fa. Bruker Daltonics, Bremen
Ethanol 96-100%	Zur Zugabe in Bakteriensuspension und Abtöten der Bakterien	Fa. Carl Roth GmbH + Co. KG., Karlsruhe
Impfösen, 10 μ l, steril, einzeln verpackt	Für Abnahme der Bakterienkolonien und Herstellung der Bakteriensuspension im Tube	Fa. Greiner bio-one, Frickenhausen
Microflex LT	Gerät für die MALDI-TOF MS	Fa. Bruker Daltonics, Bremen
MSP 96 target ground steel, microScout Target; MSP 96 target polished steel, microScout Target	Stahlträger zum Beladen mit Bakteriensuspension für die MALDI-TOF MS	Fa. Bruker Daltonics, Bremen
Organische Lösung	500 μ l Acetonitril, 475 μ l DEPC-Wasser und 25 μ l Trifluoressigsäure mischen; für das Lösen des Bakterienstandards und der α –HCCA	
Safe-Lock Tubes 2,0 ml	In Tubes findet Vorbereitung der Bakteriensuspension und Weiterverarbeitung statt	Fa. Eppendorf AG, Hamburg
Trifluoressigsäure > 99,9%	Bestandteil der organischen Lösung	Fa. Carl Roth GmbH + Co. KG., Karlsruhe
Vortexer-Genie™	Mischer	Fa. Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz

Materialien für Extraktion der Corynebakterien DNA

MATERIAL	VERWENDUNGSZWECK/ERKLÄRUNG	FIRMA
10x PBS-Puffer	Zur Herstellung eines 1x PBS-Puffers: 10x PBS 1:10 mit Aqua dest. verdünnen; 1x PBS-Puffers wird zur Erstellung einer Bakteriensuspension aus Corynebakterien-Reinkulturen benötigt	Fa. Fluka, Oberhaching
Eppendorf Centrifuge 5430	Zentrifuge	Fa. Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Dualfilter epT.I.P.S., 0,1 – 1000 µl	Filtertips für Kolbenhubpipetten	Fa. Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Reference™ (variabel und fix)	Kolbenhubpipetten für 0,1 – 1000 µl	Fa. Eppendorf AG, Hamburg
High Pure PCR Template Preparation Kit	Kit zur Extraktion von Bakterien DNA	Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Isopropanol	Zur Aufreinigung während der Extraktion von Bakterien DNA	Fa. Merck KGaA, Darmstadt
Lysozym (L-7651)	Eine Muramidase zur Auflösung grampositiver Zellwände	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Safe-Lock Tubes 2,0 ml	Für Aufbewahrung des gewonnen Extraktions-Eluates	Fa. Eppendorf AG, Hamburg
Trizma™ hydrochloride	10 mM Tris (hydroxymethyl)-aminomethan zur Lösung von 10mg/ml Lysozym	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Thermomixer comfort	Thermoblock mit Schüttelvorrichtung für 1,5 und 2 ml Reaktionsgefäßen, um die Bakteriensuspension auf 37 °C für die Lysozym-Wirkung und auf 70 °C für die Proteinase K-Wirkung zu erwärmen	Fa. Eppendorf AG, Hamburg

Materialien für MasterMix und PCR

MATERIAL	VERWENDUNGSZWECK/ERKLÄRUNG	FIRMA
0,1% TE-Puffer	Zur Erstellung einer 100 µM Primer-Stammlösung	Fa. AppliChem GmbH, Darmstadt
0,2 ml PCR Strips mit Cups, PCR-grade	Nukleasefreie PCR-Strips; Jedes Cup wird mit 45 µl MasterMix und 5 µl Eluat der Extraktion oder Wasser, PCR-grade (MasterMix-Kontrolle) befüllt	Fa. Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldenburg
1,5 und 2,0 ml Biopur™ Safe-Lock Tubes	Nukleasefreie Tubes, in denen der MasterMix angemischt wird	Fa. Eppendorf AG, Hamburg
AmpliTaq DNA Polymerase Kit	Kit mit Taq-Polymerase, 10x Puffer II ohne MgCl ₂ und 25 mM MgCl ₂ zur Herstellung des MasterMix	Fa. Applied Biosystems, CA 94404, USA
Eppendorf Dualfilter epT.I.P.S., 0,1 – 1000 µl	Filtertips für Kolbenhubpipetten	Fa. Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Mastercycler personal	Thermozykler für die PCR	Fa. Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Reference™ (variabel und fix)	Kolbenhubpipetten für 0,1 – 1000 µl	Fa. Eppendorf AG, Hamburg
Galaxy Ministar silverline	Mikrozentrifuge; für kurzes Zentrifugieren der befüllten PCR-Strips	Fa. VWR International GmbH, Darmstadt
GeneAmp™ dNTP Blend, 10 mM	Enthält vier Stammlösungen, die 1:1:1:1 zu einem 2,5 mM pro Nukleotid dNTP-Mix gemischt werden für MasterMix => 10mM	Fa. Applied Biosystems, CA 94404, USA
HotStarTaq MasterMix Kit	Enthält bis auf Primer alle weiteren Komponenten für MasterMix	Fa. Qiagen, Hilden
<u>Primer:</u> C2700 Forward und C3130 Reverse; Cxe2718-fw und Cxe3139-re; fD1-forward und 800r-reverse	Primer für die <i>rpoB</i> -Sequenzierung; spezielle Primer für die <i>rpoB</i> -Sequenzierung; Primer für die 16S rDNA-Sequenzierung; Gebrauchslösung mit Wasser, PCR-grade, aus der Primer-Stammlösung: 10 µM	Fa. Tib MolBiol, Berlin
Vortexer-Genie™	Mischer	Fa. Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Wasser, PCR-grade	Zur Erstellung einer 10 µM Gebrauchslösung	Fa. Invitrogen GmbH, Darmstadt

Materialien für die Detektion der PCR-Produkte

MATERIAL	VERWENDUNGSZWECK/ERKLÄRUNG	FIRMA
Agilent 2100 Bioanalyser	Gerät zur Detektion der PCR-Produkte	Fa. Agilent Technologies, Waldbronn
Chip Priming station	Beladestation für den Chip des Bioanalysers	Fa. Agilent Technologies, Waldbronn
DNA 1000 LabChip Kit	Für die Detektion der PCR-Produkte mittels des Bioanalysers auf dem Prinzip der Mikrofluidik	Fa. Agilent Technologies, Waldbronn
Eppendorf Dualfilter epT.I.P.S., 0,1 – 1000 µl	Filtertips für Kolbenhubpipetten	Fa. Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Reference™ (variabel und fix)	Kolbenhubpipetten für 0,1 – 1000 µl	Fa. Eppendorf AG, Hamburg
IKA Vortex-Mixer	Spezieller Mischer für den Chip des Bioanalysers	Fa. Agilent Technologies, Waldbronn

Materialien für die Aufreinigung der PCR-Produkte

MATERIAL	VERWENDUNGSZWECK/ERKLÄRUNG	FIRMA
QIAquick PCR Purification Kit	Für die Aufreinigung der PCR-Produkte vor der Versendung zu Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg	Fa. Qiagen, Hilden
Eppendorf Centrifuge 5430	Zentrifuge	Fa. Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Dualfilter epT.I.P.S., 0,1 – 1000 µl	Filtertips für Kolbenhubpipetten	Fa. Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Reference™ (variabel und fix)	Kolbenhubpipetten für 0,1 – 1000 µl	Fa. Eppendorf AG, Hamburg
Safe-Lock Tubes 2,0 ml	Für Aufbewahrung der aufgereinigten PCR-Produkte	Fa. Eppendorf AG, Hamburg

Anlage 5: Tabellen zur Verdeutlichung des Methodenvergleichs

Tabelle 26: Isolate, die mit MALDI-TOF MS und 16S rDNA-Sequenzierung auf Speziesebene identifiziert werden konnten

Anzahl der Isolate	MALDI-TOF MS	16S rDNA-Sequenzierung
74	<i>C. xerosis</i>	
14	<i>C. ammoniagenes</i>	
13	<i>C. confusum</i>	
10	<i>C. casei</i>	
3	<i>C. camporealensis</i>	
2	<i>Brevibacterium stationis</i> *	
2	<i>C. flavescens</i>	
2	<i>C. propinquum</i>	
2	<i>C. testudinoris</i>	
1	<i>C. accolens</i>	
1	<i>C. amycolatum</i>	
1	<i>C. freneyi</i>	
1	<i>C. glutamicum</i>	
1	<i>Brevibacterium stationis</i>	<i>C. ammoniagenes</i>
127	Summe	

* Es wird vorgeschlagen *Brevibacterium stationis* dem Genus *Corynebacterium* zuzuordnen (BERNARD et al. 2010)

Tabelle 27: Isolate, die mit API Coryne und 16S rDNA-Sequenzierung auf Speziesebene identifiziert werden konnten

Anzahl der Isolate	API Coryne	16S rDNA-Sequenzierung
37	<i>C. xerosis</i>	
4	<i>C. accolens</i>	<i>C. ammoniagenes</i>
3	<i>C. jeikeium</i>	<i>C. amycolatum</i>
2	<i>C. accolens</i>	<i>Brevibacterium stationis</i> *
2	<i>C. diphtheriae mitis/belfanti</i>	<i>C. xerosis</i>
2	<i>C. propinquum</i>	<i>C. confusum</i>
2	<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	<i>C. propinquum</i>
1	<i>C. accolens</i>	<i>C. confusum</i>
1	<i>C. propinquum</i>	<i>C. accolens</i>
1	<i>C. propinquum</i>	<i>C. xerosis</i>
55	Summe	

* Es wird vorgeschlagen *Brevibacterium stationis* dem Genus *Corynebacterium* zuzuordnen (BERNARD et al. 2010)

Tabelle 28: Isolate, die mit MALDI-TOF MS und API Coryne auf Speziesebene identifiziert werden konnten

Anzahl der Isolate	MALDI-TOF MS	API Coryne
62	<i>C. xerosis</i>	
2	<i>C. accolens</i>	
1	<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	
6	<i>C. ammoniagenes</i>	<i>C. accolens</i>
5	<i>Brevibacterium stationis</i> *	<i>C. accolens</i>
4	<i>C. propinquum</i>	<i>C. pseudodiphtheriticum</i>
2	<i>C. xerosis</i>	<i>C. diphtheriae mitis/belfanti</i>
1	<i>C. accolens</i>	<i>C. propinquum</i>
1	<i>C. confusum</i>	<i>C. accolens</i>
1	<i>C. confusum</i>	<i>C. propinquum</i>
1	<i>C. xerosis</i>	<i>C. propinquum</i>
86	Summe	

* Es wird vorgeschlagen *Brevibacterium stationis* dem Genus *Corynebacterium* zuzuordnen (BERNARD et al. 2010)

Tabelle 29: Ausgewählte Isolate, bei denen MALDI-TOF MS und *rpoB*-Sequenzierung dieselbe Speziesidentifizierung lieferten

Quelle des Isolates	Ergebnis der <i>rpoB</i> -Sequenzierung	MALDI-TOF MS	Score value (MALDI)	Ergebnis der 16S rDNA-Sequenzierung	Homologie (%) 16S rDNA
Mensch	<i>C. accolens</i>	<i>C. accolens</i>	2,3	<i>C. spp.</i>	99
Mensch	<i>C. propinquum</i>	<i>C. propinquum</i>	2,4	<i>C. spp.</i>	99
Schwein	<i>C. ammoniagenes</i>	<i>C. ammoniagenes</i>	2,5	<i>C. spp.</i>	99
Schwein	<i>C. ammoniagenes</i>	<i>C. ammoniagenes</i>	2,0	<i>C. spp.</i>	96

Anlage 6: ergänzende Tabellen zum Ergebnisteil

Tabelle 30: Zusammensetzung der nasalen *Corynebacterium*-Flora und verwandter Arten bei Schweinen unterschiedlicher Altersklassen

Spezies	Saugferkel	Aufzuchtferkel	Masttiere	Jungsauen	Altsauen
<i>C. xerosis</i>	81 (99%)	81 (100%)	159 (100%)	15 (100%)	74 (100%)
<i>Brevibacterium stationis</i> *	56 (68%)	61 (75%)	92 (58%)	12 (80%)	39 (53%)
<i>C. confusum</i>	6 (7%)	4 (5%)	32 (20%)	2 (13%)	4 (5%)
<i>C. ammoniagenes</i>	6 (7%)	6 (7%)	18 (11%)		1 (1%)
<i>C. casei</i>	7 (9%)	6 (7%)	2 (1%)		3 (4%)
<i>C. camporealis</i>	2 (2%)	1 (1%)	2 (1%)		7 (10%)
<i>C. flavesens</i>	2 (2%)				
<i>C. freneyi</i>	2 (2%)	1 (1%)			
<i>C. testudinoris</i>	2 (2%)	2 (3%)	1 (1%)		1 (1%)
<i>Brachybacterium faecium</i>		1 (1%)			1 (1%)
<i>C. amycolatum</i>	1 (1%)	1 (1%)	1 (1%)		
<i>C. glutamicum</i>	1 (1%)				

* Es wird vorgeschlagen *Brevibacterium stationis* dem Genus *Corynebacterium* zuzuordnen (BERNARD et al. 2010)

Tabelle 31: Zusammensetzung der nasalen *Corynebacterium*-Flora und verwandter Arten bei Schweinen unterschiedlicher Betriebsarten

Spezies	Ferkelerzeuger	Mastbetrieb	geschlossenes System
<i>C. xerosis</i>	160 (100%)	132 (100%)	118 (99%)
<i>Brevibacterium stationis</i> *	105 (66%)	80 (61%)	75 (63%)
<i>C. confusum</i>	6 (4%)	22 (17%)	20 (17%)
<i>C. ammoniagenes</i>	7 (4%)	18 (14%)	6 (5%)
<i>C. casei</i>	9 (6%)	1 (1%)	8 (7%)
<i>C. camporealis</i>	6 (4%)	2 (2%)	4 (3%)
<i>C. testudinoris</i>	3 (2%)		3 (3%)
<i>C. amycolatum</i>	2 (1%)		1 (1%)
<i>C. freneyi</i>	2 (1%)		1 (1%)
<i>C. flavesens</i>			2 (2%)
<i>Brachybacterium faecium</i>	1 (1%)		1 (1%)
<i>C. glutamicum</i>			1 (1%)

* Es wird vorgeschlagen *Brevibacterium stationis* dem Genus *Corynebacterium* zuzuordnen (BERNARD et al. 2010)

Tabelle 32: Aufteilung der positiven Tiere nach den beteiligten Regierungsbezirken

	Oberbayern	Niederbayern	Schwaben	Oberpfalz	Mittelfranken
<i>Corynebacterium</i> spp.-positiv	129 (100%)	90 (100%)	82 (100%)	60 (100%)	50 (100%)
coryneforme Bakterien-positiv	89 (69%)	50 (56%)	53 (65%)	47 (78%)	42 (84%)

Tabelle 33: Zusammensetzung der nasalen *Corynebacterium*-Flora und verwandter Arten bei Schweinen unterschiedlicher Regionen

Spezies	Oberbayern	Niederbayern	Schwaben	Oberpfalz	Mittelfranken
<i>C. xerosis</i>	128 (99%)	90 (100%)	82 (100%)	60 (100%)	50 (100%)
<i>Brevibacterium stationis</i> *	83 (64%)	47 (52%)	48 (59%)	43 (72%)	39 (78%)
<i>C. confusum</i>	10 (8%)	13 (14%)	17 (21%)	4 (7%)	4 (8%)
<i>C. casei</i>	11 (9%)	4 (4%)	1 (1%)	2 (3%)	
<i>C. ammoniagenes</i>	10 (8%)	9 (10%)	7 (9%)	5 (8%)	
<i>C. camporealensis</i>	4 (3%)	3 (3%)	3 (4%)	1 (2%)	1 (2%)
<i>C. testudinoris</i>	2 (2%)	3 (3%)		1 (2%)	
<i>Brachybacterium faecium</i>	2 (2%)				
<i>C. amycolatum</i>	2 (2%)	1 (1%)			
<i>C. flavescens</i>	2 (2%)				
<i>C. freneyi</i>	1 (1%)	2 (2%)			
<i>C. glutamicum</i>	1 (1%)				

* Es wird vorgeschlagen *Brevibacterium stationis* dem Genus *Corynebacterium* zuzuordnen (BERNARD et al. 2010)

Tabelle 34: Zusammensetzung der nasalen und tonsillären *Corynebacterium*-Flora bei Schweinen

Spezies	Nasentupfer	Tonsillentupfer
<i>C. xerosis</i>	16 (94%)	14 (82%)
<i>Brevibacterium stationis</i> *	7 (41%)	4 (24%)
<i>C. ammoniagenes</i>	2 (12%)	3 (18%)
<i>C. casei</i>	2 (12%)	
<i>C. testudinoris</i>	2 (12%)	
<i>C. flavescens</i>	1 (6%)	
<i>C. amycolatum</i>		2 (12%)
<i>C. camporealensis</i>		1 (6%)
<i>C. confusum</i>		1 (6%)

* Es wird vorgeschlagen *Brevibacterium stationis* dem Genus *Corynebacterium* zuzuordnen (BERNARD et al. 2010)

Tabelle 35: Anteil der 41 Betriebe eingeteilt in die drei Hygienestatus und die Betriebsarten

Betriebsart	Hygienestatus I	Hygienestatus II	Hygienestatus III
Ferkelerzeuger	1 (6%)	11 (69%)	4 (25%)
Mastbetrieb		10 (77%)	3 (23%)
geschlossenes System		10 (83%)	2 (17%)

Tabelle 36: Zusammensetzung der nasalen *Corynebacterium*-Flora und verwandter Arten bei Schweinen in Abhängigkeit von bestimmten Betriebsparametern

Spezies	Hygienestatus I	Hygienestatus II	Hygienestatus III
<i>C. xerosis</i>	10 (100%)	310 (100%)	90 (100%)
<i>Brevibacterium stationis</i> *	6 (60%)	193 (62%)	61 (68%)
<i>C. confusum</i>		38 (12%)	10 (11%)
<i>C. ammoniagenes</i>	1 (10%)	28 (9%)	2 (2%)
<i>C. casei</i>		17 (6%)	1 (1%)
<i>C. camporealensis</i>		10 (3%)	2 (2%)
<i>C. testudinoris</i>		6 (2%)	
<i>C. amycolatum</i>		3 (1%)	
<i>C. freneyi</i>		3 (1%)	
<i>Brachybacterium faecium</i>		2 (1%)	
<i>C. flavescens</i>		2 (1%)	
<i>C. glutamicum</i>		1 (0,5%)	

* Es wird vorgeschlagen *Brevibacterium stationis* dem Genus *Corynebacterium* zuzuordnen (BERNARD et al. 2010)

Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. K. Heinritzi für die Bereitstellung dieses interessanten Themas sowie die Unterstützung bei Planung, Durchführung und Anfertigung dieser Arbeit.

Ebenfalls herzlich danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Ritzmann für die spontane Korrektur meiner gesamten Arbeit und die nette Betreuung kurz vor der Abgabe.

Allen Mitarbeitern der Klinik für Schweine, besonders Herrn Dr. M. Eddicks und Frau Dr. S. Zöls, danke ich für die freundliche Hilfe und Unterstützung bei dieser Arbeit und die interessanten, lehrreichen und netten Stunden in der Klinik.

Dem Bayerischen Staatsministerium für Gesundheit und Umwelt danke ich für die Bereitstellung der finanziellen Mittel zur Durchführung dieses Projektes.

Mein ganz großer Dank gilt Herrn Dr. S. Hörmansdorfer, der mich während der Anfertigung meiner Arbeit begleitet und mich mit zahlreichen Tipps und Anregungen, vielen wertvollen Hinweisen und noch mehr Geduld unterstützt hat.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. A. Berger, die mir mit ihren Erfahrungen jeder Zeit zur Seite stand, ein offenes Ohr für all meine Sorgen und Nöte hatte und immer versuchte mir nach bestem Wissen und Gewissen zu helfen den Faden und das Ziel nicht zu verlieren.

Herrn PD Dr. Dr. A. Sing danke ich für sein großes Interesse an diesem Thema und seine hilfreichen Tipps und Ratschläge im Laufe dieser Arbeit.

Frau Dr. I. Huber, Frau Dr. R. Konrad und Frau Dr. M. Pavlovic möchte ich für die wissenschaftlichen Informationen über die Molekularbiologie, die Besprechung und Ausarbeitung meiner Ergebnisse aus der MALDI-TOF MS und der Sequenzierung, der schnellen und hilfreichen Korrektur sämtlicher molekularbiologischen Abschnitte in dieser Arbeit, sowie der für mich und meine Arbeit gespendete Zeit danken.

Dem ganzen Team des F&E-Labors, besonders Anika Luze, Daniela Sebah und Karola Grünwald, ein herzliches Dankeschön für das Einlernen in die MALDI-TOF MS, PCR und Sequenzierung, die Hilfestellungen und die vielen netten, aber auch lehrreichen Stunden. Für moralischen Beistand, die Bereitstellung meines „eigenen Arbeitsplatzes“ und die gute Nervennahrung möchte ich allen Damen aus dem E- und S-Labor, der Anzucht und dem dazugehörigen Büro danken.

Frau Dr. Sauter-Louis möchte ich besonders für die statistische Betreuung der Arbeit danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Martina Brandt für ihre spontane Unterstützung bei der Subkultivierung unzähliger Platten und die tiefgründigen Gespräche. Ohne deine Hilfe säße ich sicher jetzt noch da.

Den Landwirten sowie deren Familien einen herzlichen Dank für die Teilnahme an diesem Projekt, die aufgewendete Zeit beim Helfen der Probennahmen und Beantworten des Fragebogens.

Vielen lieben Dank an Bärbel, Ebru, Sven und Rose-Leah, die mir wertvolle moralische Stütze waren und mir gute Freunde sind, auf die ich mich verlassen kann.

Ich danke meiner einmaligen Familie für die Rücksicht und die aufbauenden Worte, die sie mir während des Studiums und auch während der Doktorarbeit entgegen gebracht haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich immer uneingeschränkt und bedingungslos unterstützen, mich auffangen und aufbauen, jeder Zeit für mich da sind und mir mit Rat und Tat zur Seite stehen.

Zuletzt danke ich dir, Andy, für all deinen Beistand, dein Verständnis, deine Geduld und deinen Glauben an mich.